

Synthese, Charakterisierung und Anwendung neuer Inhibitoren der Proproteinkonvertase Furin

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Kornelia Hardes

aus Paderborn

Marburg/Lahn 2014

Erstgutachter: **Prof. Dr. Torsten Steinmetzer**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Wolfgang Garten**

Eingereicht am **05.11.2014**

Tag der mündlichen Prüfung am **17.12.2014**

Hochschulkennziffer: 1180

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Torsten Steinmetzer am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Januar 2011 bis September 2014 durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abkürzungsverzeichnis | i |
| Abbildungsverzeichnis | v |
| Tabellenverzeichnis | vii |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Proteinkonvertasen | 1 |
| 1.2. Furin | 4 |
| 1.2.1. Autoaktivierung und Lokalisation | 4 |
| 1.2.2. Physiologische und pathologische Prozesse | 6 |
| 1.2.2.1. Influenza | 8 |
| 1.2.2.2. Hundestaupe | 12 |
| 1.2.2.3. Anthrax | 14 |
| 1.2.2.4. Diphtherie | 16 |
| 1.2.3. Kristallstruktur des Furins | 18 |
| 1.2.4. Furininhibitoren | 20 |
| 1.2.4.1. Makromolekulare Inhibitoren | 20 |
| 1.2.4.2. Peptidische Inhibitoren | 21 |
| 1.2.4.3. Nicht-peptidische Inhibitoren | 23 |
| 2. Ziel der Arbeit | 26 |
| 3. Ergebnisse und Diskussion | 28 |
| 3.1. Modifizierung des P3-Rests | 28 |
| 3.1.1. Synthese der P3-Derivate | 29 |
| 3.1.2. Bestimmung der Hemmkonstanten | 30 |
| 3.1.3. Synthese der <i>tight-binding</i> Inhibitoren | 35 |
| 3.1.4. Bestimmung der Inhibitorkonstanten der <i>tight-binding</i> Inhibitoren | 36 |
| 3.1.5. Zellkulturversuche mit Anthraxtoxin | 38 |
| 3.1.6. Zellkulturversuche mit Diphtherietoxin | 40 |
| 3.1.7. Zellkulturversuche mit Influenzaviren | 42 |
| 3.1.8. Zellkulturversuche mit dem Hundestaupevirus | 46 |
| 3.1.9. Selektivitätsbestimmung mit PC1/3 und PC2 | 48 |
| 3.2. Kristallstruktur des humanen Furins im Komplex mit Inhibitor MI-1148 | 52 |
| 3.3. Einbau der Tranexamsäure als P5-Rest | 56 |
| 3.4. Derivate mit N-terminalem D-Arg-Resten | 57 |
| 3.5. Inhibitoren ohne P5-Rest | 62 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 3.6. | Verlängerte Derivate mit N-terminalem Phenylacetylrest | 65 |
| 3.7. | Einbau des Glutaminsäurerests in P3-Position | 67 |
| 3.8. | Furinhemmstoffe mit Agmatin- und Noragmatinrest in P1-Position | 68 |
| 3.9. | Modifizierung der Furinhemmstoffe mit zellpenetrierende Peptiden | 72 |
| 3.10. | Palmitoylierte Furinhemmstoffe..... | 79 |
| 3.11. | Lokalisationsuntersuchungen eines FITC-markierten Furininhibitors | 81 |
| 3.12. | Auswahl des geeigneten Substrates für enzymkinetische Studien | 86 |
| 4. | Zusammenfassung | 90 |
| 4.1. | Derivate der P3-Serie | 90 |
| 4.2. | Einbau von Tranexamsäure als P5-Rest | 92 |
| 4.3. | Derivate mit N-terminalem D-Arg-Resten | 92 |
| 4.4. | Verkürzte und verlängerte Derivate | 93 |
| 4.5. | Einbau des Glutaminsäurerests in P3-Position..... | 94 |
| 4.6. | Furinhemmstoffe mit Agmatin- und Noragmatinrest in P1-Position | 94 |
| 4.7. | Modifizierung der Furinhemmstoffe mit zellpenetrierenden Peptiden | 95 |
| 4.8. | Palmitoylierte Furinhemmstoffe..... | 95 |
| 4.9. | Lokalisationsuntersuchungen eines FITC-markierten Furininhibitors | 96 |
| 4.10. | Enzymkinetische Charakterisierung der Substrate | 96 |
| 5. | Experimenteller Teil..... | 97 |
| 5.1. | Material und Methoden | 97 |
| 5.1.1. | Verwendete Materialien | 97 |
| 5.1.2. | Peptidsynthese | 97 |
| 5.1.3. | HPLC..... | 98 |
| 5.1.3.1. | Analytische HPLC..... | 98 |
| 5.1.3.2. | Präparative HPLC..... | 98 |
| 5.1.4. | Lyophilisierung | 99 |
| 5.1.5. | Massenspektrometrie..... | 99 |
| 5.1.6. | NMR-Spektroskopie..... | 99 |
| 5.1.7. | Elementaranalyse..... | 99 |
| 5.2. | Enzymkinetische Messungen | 100 |
| 5.2.1. | Messungen mit Furin..... | 100 |
| 5.2.1.1. | Bestimmung der IC ₅₀ -Werte | 100 |
| 5.2.1.2. | Hemmung durch klassische, reversible und kompetitive Inhibitoren | 100 |
| 5.2.1.3. | Bestimmung der Hemmung durch <i>tight-binding</i> Inhibitoren | 101 |
| 5.2.2. | Kinetische Messungen mit mPC1/3 und mPC2 | 102 |
| 5.3. | Synthese der Inhibitoren..... | 103 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.3.1. | Generelle Methoden | 105 |
| 5.3.2. | Synthese der Vorstufen..... | 107 |
| 5.3.3. | Synthese der Inhibitores des Typs R-Phac-Arg-P3-Arg-4-Amba | 109 |
| 5.3.4. | Synthese der P4 - P1-Derivate..... | 111 |
| 5.3.5. | Weitere Modifizierungen im N-terminalen Segment | 113 |
| 5.3.6. | Kombination basischer P5-Reste mit Glu in P3 | 114 |
| 5.3.7. | Synthese der Noragmatin- und Agmatin- Derivate | 115 |
| 5.3.8. | Palmitoyl-Derivate | 116 |
| 5.3.9. | Synthese der Zellpenetrierenden Peptidderivate | 117 |
| 5.4. | Synthese von 4-GMe-Phac-Arg-Lys(β -Ala-FITC)-Arg-4-Amba \times 4 TFA..... | 117 |
| 5.5. | Zellkulturversuche zur Lokalisation des FITC-markierten Furininhibitors mittels Immunofluoreszenz | 118 |
| 5.5.1. | Verwendete Zelllinien | 118 |
| 5.5.2. | Western Blot und SDS-Page | 119 |
| 5.5.3. | Immunofluoreszenz | 119 |
| 5.6. | Synthese des Fluoreszenzsubstrates Phac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC (MI-0730) | 119 |
| 5.7. | Bestimmung der k_{cat}/K_m -Werte der Substrate mittels Progresskurven-Analyse..... | 120 |
| 6. | Literaturverzeichnis..... | 121 |
| 7. | Anhang | 135 |
| 7.1. | Verwendete Inhibitoren | 135 |
| 7.2. | Verwendete Messparameter des Tecan Safire ² | 136 |
| 7.3. | NMR-Spektren | 137 |
| 7.4. | Zellkulturversuche mit Anthrax | 142 |
| 7.5. | Zellkulturversuche mit Diphtherietoxin | 142 |
| 7.6. | Zellkulturversuche mit Influenza | 143 |
| 7.6.1. | Verwendete Zellkulturen, Virusstämme und Inhibitorlösungen | 143 |
| 7.6.2. | Zytotoxizitätstest | 143 |
| 7.6.3. | Immunfärbung | 144 |
| 7.7. | Zellkulturversuche mit CDV | 144 |
| 8. | Danksagung | 145 |
| 9. | Lebenslauf | 147 |
| 10. | Erklärung | 148 |

Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen der Aminosäuren und ihre Derivate entsprechen den Empfehlungen der IUPAC-IUBMM *Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN) und des *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) und werden im Ein- oder Drei-Buchstabencode verwendet.

Sofern nicht anders gekennzeichnet, besitzen alle Aminosäuren und Derivate eine L-Konfiguration.

| | |
|--------------------|--|
| α_1 -PDX | α_1 -antitrypsin Portland |
| α_2 -M | α_2 -macroglobulin |
| β -NGF | nerve growth factor |
| 4-Amba | 4-Amidinobenzylamid |
| 6-Cl-HOBt | 6-chloro-1-Hydroxybenzotriazol |
| Å | Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$) |
| 2-Abu | 2-Aminobuttersäure |
| Ac | Acetyl |
| ACN | Acetonitril |
| 1-Adg | Adamantylglycin |
| Ado | 8-(Amino)-3,6-dioxa-ocatansäure |
| Aib | α -Methylalanin |
| AMC | 7-Amino-4-methylcoumarin |
| AMe | Aminomethyl |
| AP | Adapterprotein |
| AS | Aminosäure |
| ber. | berechnet |
| Boc | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl |
| Boc ₂ O | Di- <i>tert</i> -Butyloxycarbonat |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| cAMP | zyklisches AMP |
| Cbz | Benzyloxycarbonyl |
| CDV | <i>canine distemper virus</i> , Hundestaupevirus |
| Cha | Cyclohexylalanin |
| CK2 | Casein-Kinase 2 |
| CMC | kritische Mizellbildungskonzentration |

| | |
|-----------|--|
| CMG2 | <i>capillary morphogenesis protein 2</i> |
| CMK | Chloromethylketon |
| CPP | <i>Cell-penetrating peptides</i> , Zellpenetrierende Peptide |
| Cpa | Cyclopropylalanin |
| D9R | nona-D-Arginin-Amid |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCM | Dichlormethan |
| Dde | 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl |
| Dec | Decanoyl |
| DIPEA | <i>N,N</i> -Diisopropylethylamin |
| DMF | <i>N,N</i> -Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EF | Ödem-Faktor |
| EF-2 | Elongationsfaktors 2 |
| eq. | Moläquivalente |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERGIC | ER-Golgi-intermediäre Kompartiment |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| Fmoc | 9-Fluorenylmethoxycarbonyl |
| F-Protein | Fusionsprotein |
| FPV | <i>fowl plague virus</i> , klassische Geflügelpest |
| gef. | gefunden |
| ges. | gesättigt |
| GHRH | Wachstumshormon-freisetzendes Hormon |
| GMe | Guanidinomethyl |
| HA | Hämagglutinin |
| HAT | <i>human airway trypsin-like protease</i> |
| HB-EGF | Heparin-bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktor |
| HBTU | O-(Benzotriazol-1-yl)-tetramethyluronium Hexafluorophosphat |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure |
| hERG | <i>human ether-a-go-go-related gene</i> |
| HOBt | 1-Hydroxybenzotriazol |

| | |
|-----------------------------|--|
| HPAI | Hochpathogene aviäre Influenza-Viren |
| HPLC | <i>high performance liquid chromatography</i> |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase |
| HTS | <i>high-throughput screening</i> , Hochdurchsatzscreening |
| I α Ip | Inter- α -inhibitor Protein |
| IC ₅₀ | Inhibitorkonzentration bei halbmaximaler Hemmung |
| IL-1 β | Interleukin-1 β |
| ISGs | unreife sekretorische Granula |
| k _{cat} | maximaler Substratumsatz eines Enzyms pro Zeiteinheit |
| kDa | Kilodalton |
| K _i | Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes |
| K _i [*] | apparente Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes |
| K _m | Michaelis-Menten-Konstante |
| k _{obs} | apparente pseudo-erster Ordnungsgeschwindigkeitskonstante |
| LF | Letal-Faktor |
| LM | Lösungsmittel |
| LRP | <i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> |
| M | molar |
| MAPKKs | Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinasen |
| MDCK II | <i>Madin-Darby canine kidney II</i> (Zellen) |
| MeOH | Methanol |
| MM | <i>Magic Mixture</i> |
| MOI | <i>Multiplicity of Infection</i> |
| MS | Massenspektrometrie |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| MW | Molekulargewicht |
| Nle | Norleucin |
| NMM | <i>N</i> -Methylmorpholin |
| NMP | <i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon |
| NMR | Kernspinresonanzspektroskopie |
| Nva | Norvalin |
| OMTKY3 | <i>turkey ovomucoid third domain</i> |
| OtBu | <i>o</i> - <i>tert</i> -Butylester |
| PA | protektives Antigen |

| | |
|------------------|---|
| PACE4 | <i>paired basic amino acid cleaving enzyme 4</i> |
| PACS-1 | <i>phosphofurin acidic cluster sorting protein-1</i> |
| Pbf | 2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl |
| PC | Proteinkonvertase |
| Pen | Penicillamin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pGlu | Pyroglutaminsäure |
| pH | <i>potentia Hydrogenii</i> |
| Phac | Phenylacetyl |
| PI8 | Proteinaseinhibitor 8 |
| pKa | negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante |
| pNA | <i>para</i> -Nitroanilin |
| POMC | Proopiomelanocortin |
| PTFE | Polytetrafluoroethylen |
| PyBOP | Benzotriazolyl-1-oxy-tripyrilidino-phosphonium Hexafluorophosphat |
| RFU | relative Fluoreszenz-Einheit |
| RT | Raumtemperatur |
| SPPS | <i>solid phase peptide synthesis</i> – Festphasenpeptidsynthese |
| Tba | <i>tert</i> -butyl Alanin |
| tBu | <i>tert</i> -Butylester |
| TEM8 | <i>tumor endothelium marker 8</i> |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TGFβ1 | <i>transforming growth factor</i> |
| TGN | Trans-Golgi-Netzwerk |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TIS | Triisopropylsilan |
| Tle | <i>tert</i> -Leucin |
| TMPRSS2 | <i>transmembrane protease serine 2</i> |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor alpha |
| t _R | Retentionszeit |
| Trt | Trityl |
| V _{max} | Maximalgeschwindigkeit des Enzyms |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----|--|----|
| 1 | Einordnung der Proproteinkonvertasen innerhalb der Serinproteasen. | 1 |
| 2 | Autokatalytische Aktivierung des Furins. | 5 |
| 3 | Intrazelluläre Lokalisation des Furins. | 6 |
| 4 | Furinkatalysierte Aktivierung viraler und bakterieller Proteine in unterschiedlichen Zellkompartimenten. | 8 |
| 5 | Replikationszyklus des Influenza-Virus. | 10 |
| 6 | Replikationszyklus des Hundestaupavirus. | 13 |
| 7 | Schematischer Wirkmechanismus des Anthraxtoxins. | 15 |
| 8 | Schematischer Wirkmechanismus des Diphtherietoxins. | 18 |
| 9 | Komplex des irreversibel hemmenden Inhibitors Dec-RVKR-CMK im aktiven Zentrums des mFurins. | 19 |
| 10 | Peptidische Inhibitoren des Furins. | 23 |
| 11 | Nicht-peptidische Inhibitoren des Furins. | 25 |
| 12 | Allgemeine Struktur der synthetisierten Inhibitoren mit modifizierter P3-Aminosäure. | 28 |
| 13 | Hemmung des Furins durch Inhibitor MI-1134 (Phac-Arg-Cha-Arg-4-Amba). | 31 |
| 14 | Inter- und intramolekulare Van-der-Waals-Wechselwirkungen der P3-Tle-Seitenkette von Boceprevir mit der NS3-Protease des Hepatitis-C-Virus (PDB: 2OC8). | 32 |
| 15 | Modifizierung der P3-Position. | 34 |
| 16 | Hemmung des Furins durch Inhibitor MI-1148 . | 37 |
| 17 | Schutzwirkung ausgewählter Inhibitoren gegen Anthraxtoxin in murinen Makrophagen. | 39 |
| 18 | Schutzwirkung ausgewählter Inhibitoren gegen Diphtherietoxin in Vero-Zellen. | 41 |
| 19 | Konzentrationsabhängige Schutzwirkung der Inhibitoren MI-0701 und MI-1148 gegen 0,1, 1, 10 und 100 ng/ml ungespaltenes Diphtherietoxin. | 42 |
| 20 | Bestimmung der Zytotoxizität ausgewählter Inhibitoren auf MDCK II-Zellen mit dem MTT-Test nach Inkubation über 24 h und 48 h. | 43 |
| 21 | Hemmung der Virusausbreitung in MDCK II-Zellen durch ausgewählte Inhibitoren. | 45 |
| 22 | Infektion von VeroSLAMdogtag-Zellen mit CDV in Gegenwart der Furinhemmstoffe D9R , MI-1116 , MI-0701 und MI-1148 . | 47 |
| 23 | Progresskurven in Gegenwart einer Konzentration von 1 μ M der Inhibitoren MI-0227 , MI-1148 und in Abwesenheit eines Inhibitors mit PC1/3 und PC2 in Anwesenheit des Substrates pGlu-RTKR-AMC. | 49 |
| 24 | Bestimmte Restaktivität der PC1/3-katalysierten Spaltung des Substrates pGlu-RTKR-AMC in Gegenwart von Inhibitorkonzentrationen von 1 μ M. | 50 |
| 25 | Bestimmte Restaktivität der PC2-katalysierten Spaltung des Substrates pGlu-RTKR-AMC in Gegenwart von Inhibitorkonzentrationen von 1 μ M. | 50 |

| | | |
|----|--|-----|
| 26 | Stereobild des Furins im Komplex mit Inhibitor MI-1148 . | 52 |
| 27 | Darstellung des aktiven Zentrums des Furins im Komplex mit dem Inhibitor MI-1148 . | 54 |
| 28 | Vergleich der Kristallstrukturen des hFurins mit Inhibitor MI-0052 und MI-1148 . | 55 |
| 29 | Furinhemmung durch Inhibitor MI-1184 . | 60 |
| 30 | Bestimmung der Zytotoxizität der Inhibitoren auf MDCK II-Zellen mithilfe des MTT-Assays nach Inkubation über 24 h und 48 h. | 61 |
| 31 | Hemmung der Virusausbreitung in MDCK II-Zellen. | 61 |
| 32 | Schutzwirkung ausgewählter Inhibitoren gegen Anthraxtoxin in murinen Makrophagen. | 64 |
| 33 | Bestimmung der Zytotoxizität der Agmatin- und Noragmatinderivate auf MDCK II-Zellen mittels MTT-Test nach der Inkubation über 24 h und 48 h. | 71 |
| 34 | Hemmung der Virusausbreitung in MDCK II-Zellen. | 72 |
| 35 | Dixon-Auftragung der Furinhemmung durch Inhibitor MI-1143 bei Substratkonzentrationen von 5, 20 und 50 μ M. | 74 |
| 36 | Hill-Auftragung für die Hemmung des Furins durch Inhibitor MI-0227 und MI-1141 bei Substratkonzentrationen von 5, 20 und 50 μ M. | 75 |
| 37 | Hemmung des Furins durch Inhibitor MI-1144 . | 76 |
| 38 | Viabilität der MDCK II-Zellen nach 24 h oder 48 h Inkubation mit 25 μ M und 50 μ M Inhibitor bei 37 °C. | 77 |
| 39 | Hemmung der Ausbreitung des FPV durch die CPP-Furininhibitorkonjugate. | 78 |
| 40 | Furinhemmung durch die Palmitoyl-Derivate MI-1132 , MI-1133 und MI-1145 . | 80 |
| 41 | Untersuchungen zur furinkatalysierten HA-Spaltung in Anwesenheit des FITC-markierten Inhibitors MI-1190 sowie der Referenzverbindungen MI-0701 , MI-1189 und MI-1148 in 293T-Zellen. | 85 |
| 42 | Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Huh-7-Zellen nach Inkubation mit dem Inhibitor MI-1190 über 24 h. | 86 |
| 43 | v/S-Charakteristiken der Furinsubstrate Pyr-RTKRAMC, Ac-RVRR-AMC und Phac-RVRR-AMC. | 88 |
| 44 | Furikatalysierte Hydrolyse des Substrates MI-0730 . | 89 |
| 45 | ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum des 4-Amidinobenzylamins $\times 2 \text{ HCl}$ in $\text{DMSO-}d_6$. | 138 |
| 46 | ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum der Boc-Tranexamsäure in $\text{DMSO-}d_6$. | 139 |
| 47 | ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum des Fmoc-Tle-OH in $\text{DMSO-}d_6$. | 140 |
| 48 | ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum des Inhibitors MI-1136 in $\text{DMSO-}d_6$. | 141 |
| 49 | ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum des Inhibitors MI-1148 in $\text{DMSO-}d_6$. | 142 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|----|--|-----|
| 1 | Übersicht der furinartigen PCs. | 3 |
| 2 | Klassifizierung der Furininhibitoren in Makromoleküle, Peptide und nicht-peptidische Inhibitoren. | 20 |
| 3 | Hemmung des humanen Furins durch Inhibitoren mit basischem P5-Rest.. | 38 |
| 4 | Charakteristische Aminosäurereste im S1 - S5 Segment. | 48 |
| 5 | Synthetisierte Tranexamsäurederivate. | 56 |
| 6 | Synthetisierte Derivate mit den bestimmten K_i -Werten. | 59 |
| 7 | Furinhemmung durch die Inhibitoren ohne P5-Rest. | 63 |
| 8 | Furinhemmung durch verlängerte Derivate mit N-terminalen Phenylacetylrest. | 66 |
| 9 | Hemmung des Furins durch Inhibitoren mit Glutaminsäure in P3-Position. | 68 |
| 10 | Furinhemmung durch Noragmatin- und Agmatin-Derivate. | 71 |
| 11 | Hemmung des Furins durch CPP-Konjugate. | 75 |
| 12 | Palmitoylierte Furinhemmestoffe. | 81 |
| 13 | Struktur des markierten Inhibitors sowie seiner Vorstufe und die bestimmten K_i -Werte. | 84 |
| 14 | Übersicht der getesteten AMC-Substrate und ihre enzymkinetischen Parameter K_m , V_{max} und $\frac{k_{cat}}{K_m}$. | 87 |
| 15 | Parameter der analytischen HPLC. | 98 |
| 16 | Parameter der präparativen HPLC. | 98 |
| 17 | Messansatz zur Bestimmung der Restaktivität von PC1/3 und PC2 in Anwesenheit ausgewählter Inhibitoren. | 102 |
| 18 | Für die Festphasenpeptidsynthese verwendete Fmoc-Aminosäurederivate. | 104 |
| 19 | Programmierung des Peptidsyntheseroboters für den ersten und die nachfolgenden Zyklen der SPPS. | 105 |
| 20 | Messparameter des Tecan Safire ² während der enzymkinetischen Messungen. | 137 |

1. Einleitung

1.1. Propeptidkonvertasen

Die Analyse des humanen Genoms lässt auf das Vorhandensein von ca. 600 unterschiedlichen proteolytischen Enzymen schließen.¹ Diese können basierend auf den am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren sowie dem Katalysemechanismus in Serin-, Metallo-, Cystein-, Aspartyl- und Threoninproteasen eingeteilt werden. Der Clan der Glutaminylproteasen kommt nicht in Menschen vor.² Der Mensch exprimiert ca. 200 unterschiedliche Serinproteasen, was etwa 1 % aller gebildeten Proteine entspricht. Die meisten Serinproteasen besitzen eine chymotrypsin- oder subtilisinartige Faltung. Die letzteren können weiter in die prokaryotische Unterfamilie S8A, die dem bakteriellen Subtilisin Carlsberg ähnelt, und die eukaryotische Unterfamilie S8B, die vom Kexin aus *Saccharomyces cerevisiae* abgeleitet wird, eingeteilt werden. Die furinartigen Propeptidkonvertasen (PCs), zu denen neben Furin auch PC1/3, PC2, PC4, PC5/6, PC7 und PACE4 gehören, zählen zur Unterfamilie S8B, während das pyrolysintartige SKI-1 und das Proteinase K-ähnliche PCSK9 zur Unterfamilie S8A gehören.³

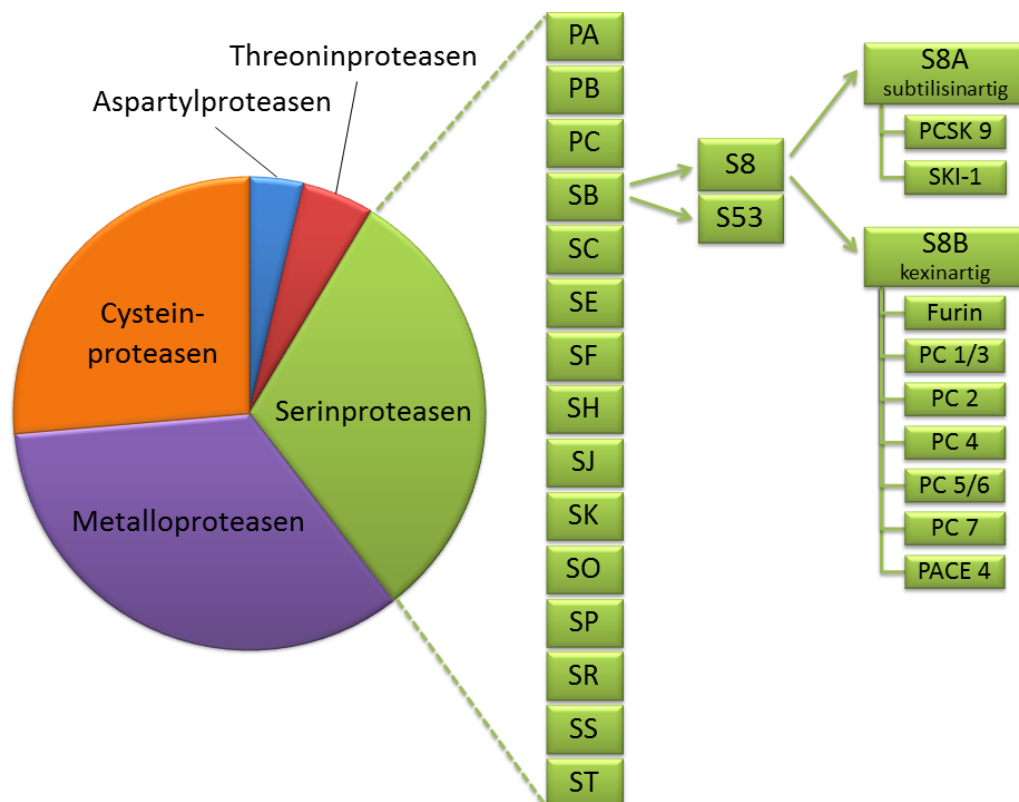


Abbildung 1: Einordnung der Propeptidkonvertasen innerhalb der Serinproteasen. Die Serinproteasen werden in 15 Clans (PA - ST) untergliedert, die weiter in Familien und Unterfamilien eingeteilt werden. Aufgrund ihrer Homologie zu den kexinartigen Serinproteasen gehören die furinartigen PCs zur Unterfamilie S8B. Zur besseren Übersicht ist nur die Einteilung der humanen PCs dargestellt.⁴

PCs spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung zahlreicher Vorläuferproteine im sekretorischen Weg der Zelle. Sie aktivieren eine Reihe von Hormonen, Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle. Verschiedene *knockout*-Studien in der Maus zeigen die Bedeutung der PCs vor allem in der Embryonalentwicklung. In Tabelle 1 sind die *knockout*-Phänotypen der einzelnen PCs zusammengefasst.⁵⁻⁷ Zusätzliche Studien mit einem gewebspezifischen *knockout* des Furins in der Leber erwachsener Mäuse zeigen, dass einige Furinsubstrate, wie zum Beispiel Albumin oder der Insulin-Rezeptor, auch in Abwesenheit von Furin prozessiert werden können, was für eine gewisse Redundanz der PCs spricht.⁸ Die Ursache für die fehlende Redundanz während der Embryogenese konnte bisher nicht identifiziert werden. Neben den physiologischen Substraten werden aber auch zahlreiche bakterielle Toxine und virale Oberflächenproteine durch PCs aktiviert. Die furinartigen PCs spalten ihre Substrate nach spezifischen einzeln oder paarig auftretenden basischen Aminosäuren mit dem Motiv (R/K)-X_n-(R/K)↓, wobei der Pfeil die Spaltstelle symbolisiert und X_n für einen 0, 2, 4 oder 6 Aminosäuren langen Linker steht.⁶

Der schematische Aufbau der Domänenstruktur der furinähnlichen PCs in Tabelle 1 zeigt deren hohe strukturelle Ähnlichkeit. Die Sequenzhomologie der katalytischen Domäne der PCs zu Furin beträgt 54 – 70 %.⁹ Alle furinartigen PCs besitzen ein Signalpeptid, ein Prosegment, die katalytische Domäne sowie eine P-Domäne. Das N-terminale Signalpeptid ist für die Translokation des Enzyms in das ER verantwortlich. Das Prosegment enthält mehrere basische Aminosäuren, nach denen die primäre und später die sekundäre autokatalytische Aktivierung stattfinden. Die Ca²⁺-abhängige subtilisinartige Proteasedomäne enthält im aktiven Zentrum die konservierte katalytische Triade bestehend aus den Aminosäuren Asp, His und Ser. Die hochkonservierte P-Domäne ist für die korrekte Faltung des Enzyms essentiell und für die Ausbildung einer Ca²⁺-Bindestelle verantwortlich. Die geringsten Sequenzhomologien befinden sich in der C-terminalen Region der PCs. Je nach intrazellulärer Lokalisation findet man hier zum Beispiel zusätzlich eine Cys-reiche Domäne, eine zytoplasmatische Domäne, eine Transmembran-Domäne oder eine amphipathische Helix.¹⁰ Im Folgenden soll auf die strukturellen und biologischen Aspekte des Furins näher eingegangen werden.

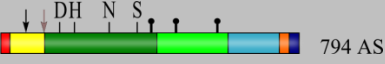
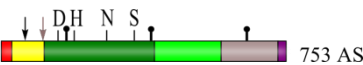

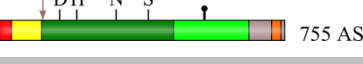
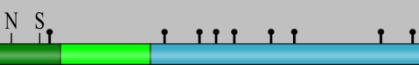


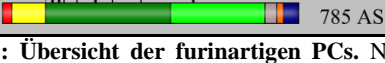
| Proteinkonvertase (Gen) | Vorkommen | Subzelluläre Lokalisation | Null-Phänotyp | Mögliche Indikationen für Inhibitoren |
|---|---|--|--|---|
| Furin  (FURIN) 794 AS | Ubiquitär | TGN, Zelloberfläche, Endosomen | Embryonisch letal an Tag 11 Embryonaler Dimorphismus: fehlerhafte axiale Drehung und Herzentwicklung | Virale Infektionen (Influenza, Masern, Dengue-Fieber), Bakterielle Infektionen (Shiga Toxin, Anthrax, Diphtheria), Krebs, Tumor-Metastase, Arthritis |
| PC1/3  (PCSK1) 753 AS | Neuroendokrines System | Sekretorische Vesikel | Minderwuchs, gestörte GHRH- & POMC- Prozessierung, Hyperproinsulinämie, | Neuroendokrine Krebsarten (Insulinoma), Diabetes |
| PC2  (PCSK2) 638 AS | Neuroendokrines System | Sekretorische Vesikel | Hypoglykämie, Proinsulinämie, Glukagonmangel, gestörte Opioidpeptid-Prozessierung, verzögertes Wachstum | Hypersteroidal-bedingte Krebsarten (Hypophysenadenom, Bronchialtumore) Diabetes |
| PC4  (PCSK4) 755 AS | Keimzellen: Testikuläre Zellen Ovariale Zellen | Zelloberfläche ? | männlich: Unfruchtbarkeit weiblich: reduzierte Fruchtbarkeit | Kontrazeptivum für Männer |
| PC5/6  (PCSK5) 913 AS  1860 AS | Weite Verbreitung: Nebennierenrinde, Darm, Niere, ovariale Zellen | A: Sekretorische Vesikel B: TGN, Endosomen | Embryonisch letal nach Implantation (4,5 - 6,5 Tage) | Dyslipidämie, Kardiovaskuläre Erkrankungen |
| PACE4  (PCSK6) 969 AS | Weite Verbreitung: Muskeln, Herz, Hypophyse, Darm Kleinhirn, Niere | TGN, Zelloberfläche, Endosomen, EZM | Zu 25% embryonisch letal an Tag 15,5, Kraniofaziale & ZNS- Defekte, rechtsaterialer Isomerismus | Arthritis , Krebs |
| PC7  (PCSK7) 785 AS | Ubiquitär | TGN, Zelloberfläche, Endosomen | Thymusdefekte, Angstverlust | Arthritis, Angststörungen |

Tabelle 1: Übersicht der furinartigen PCs. N-Glykosylierungen (T) und die autokatalytischen Spaltstellen (primäre Spaltstellen sind mit hellgrauen und sekundäre mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet) sind hervorgehoben. Alle kexinähnlichen PCs bestehen aus einem Signalpeptid (rot), einem Prosegment (gelb), einer katalytischen Domäne (dunkelgrün) und einer P-Domäne (hellgrün), die das aktive Zentrum stabilisiert. Einige PCs enthalten zusätzlich eine Cys-reiche Domäne (hellblau), eine zytoplasmatische Domäne (dunkelblau), eine Transmembran-Domäne (orange) oder eine amphipatische Helix (lila). Die Reste der katalytischen Triade und das Asn (Asp im Fall von PC2), des *oxyanion hole*, sind im Ein-Buchstaben-Code gekennzeichnet. Abkürzungen: ZNS: zentrales Nervensystem, GHRH: Wachstumshormon-freisetzendes Hormon, EZM: extrazelluläre Matrix, POMC: Proopiomelanocortin.⁵⁻⁷

1.2. Furin

Der Name Furin leitet sich von dem korrespondierenden Gen FUR ab, das sich oberhalb des FES/FPS Protoonkogens (FUR: FES/ FPS *upstream region*) befindet und Ähnlichkeiten zu dem Gen des bereits bekannten Protease Kex2 der Hefe zeigt.¹¹ Furin wurde in den folgenden Jahren intensiv untersucht und gilt als Prototyp der humanen PCs.^{12; 13} Das Enzym wird ubiquitär exprimiert und kommt in allen Wirbeltieren und in vielen wirbellosen Tieren vor.^{14; 15} Das strikt Ca^{2+} -abhängige Furin spaltet bevorzugt C-terminal an einem Arginin an einer multibasischen Erkennungssequenz mit dem Konsensusmotiv -R-X-R/K-R↓-X-, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht.¹⁶ Es ist ein Typ I-Transmembranprotein mit einer Gesamtlänge von 794 Aminosäuren bei Menschen. Die Präproform des Furins besitzt ein Signalpeptid mit einer Länge von 24 Aminosäuren, eine Prodomäne mit 83 Resten, gefolgt von einer Kette aus 687 Aminosäuren. Diese besteht aus einer subtilisinähnlichen Proteasedomäne mit der katalytischen Triade Ser368, His194 und Asp153, einer P-Domäne, einer Cys-reichen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne. Die glykosylierte und phosphorylierte Proform hat ein Gewicht von etwa 96 kDa, während das der reifen Form bei 90 kDa liegt.¹⁷

1.2.1. Autoaktivierung und Lokalisation

Die Aktivierung des Furins ist ein mehrstufiger Prozess, bei der durch eine zweifache autokatalytische Spaltung das aktive Enzym entsteht. Präprofurin wird am rauen ER der Zelle exprimiert und durch Vermittlung des 24 Aminosäure-langen Signalpeptids in das Lumen des ERs abgegeben. Durch kotranslationale Abspaltung des Signalpeptids liegt das inaktive Profurin vor. Im ER agiert die Prodomäne als intramolekulares Chaperon, das die korrekte Faltung der Proteasedomäne ermöglicht. Des Weiteren werden die Disulfidbrücken innerhalb des Enzyms ausgebildet und zwei N-Glykosilierungen finden am Asn387 sowie Asn440 statt.^{18; 19} Im Folgenden kommt es nach R104-T-K-R107↓ zu einer ersten schnellen autokatalytischen und Ca^{2+} -abhängigen Abspaltung des Propeptids im frühen Golgi-Komplex.¹⁷ Die Prodomäne bleibt jedoch noch an Furin gebunden und dient als effizienter Autoinhibitor ($\text{IC}_{50} = 14 \text{ nM}$).²⁰ Dieser Komplex wird über das ER-Golgi-intermediäre Kompartiment (ERGIC) zum Golgi-Apparat transportiert. Dort findet die Modifizierung der N-glykosidischen Zucker zu komplexen Zuckerketten statt.¹⁸ Es folgt der Transport zum TGN, indem die zweite autokatalytische Spaltung hinter der Sequenz R70-G-V-T-K-R75↓ in

einem relativ sauren Milieu mit einer Halbwertszeit von ca. 105 min deutlich langsamer als die erste Spaltung stattfindet.^{9; 21} Es folgt die schnelle Dissoziation der Prodomänenfragmente, wodurch Furin seine aktive Form erlangt. Nach der vollständigen Aktivierung ist Furin im TGN lokalisiert, von wo es durch Vermittlung der zytoplasmatischen Domäne in Richtung Endosomen und Zelloberfläche transportiert wird.²²

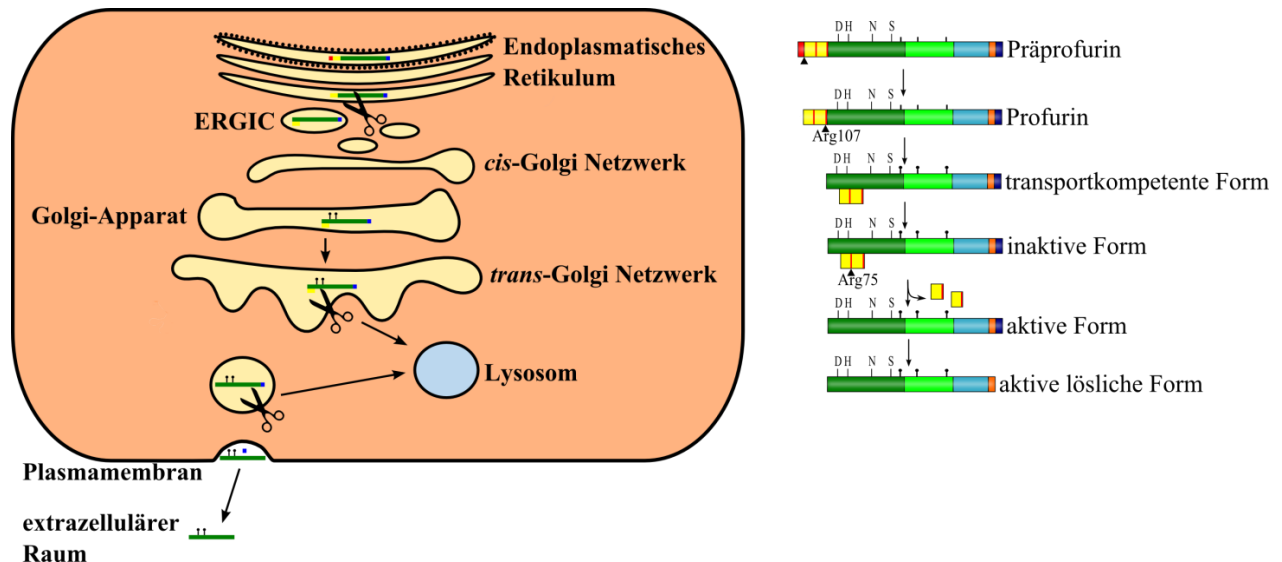


Abbildung 2: Autokatalytische Aktivierung des Furins. Am rauen ER wird Präprofurin synthetisiert und das Signalpeptid kotranslational abgespalten. Es folgt die Faltung, N-Glykosylierung und schließlich die Abspaltung der Prodomäne, die aber an der katalytischen Domäne gebunden bleibt. Diese transportkompetente Form gelangt über das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) in den Golgi-Apparat, wo die Modifizierung der Zucker stattfindet. Im TGN kommt es zu einer zweiten autokatalytischen Spaltung und zum Ablösen der Fragmente der Prodomäne, wodurch das enzymatische aktive Furin entsteht.

In Abbildung 3 ist die unterschiedliche Lokalisierung des Furins dargestellt. Durch die Bindung an das Adapterprotein 1 (AP-1) verlässt Furin das TGN in Richtung der Endosomen oder durch Bindung an AP-4 in Richtung der basolateralen Zelloberfläche. In endokrinen und neuroendokrinen Zellen vermittelt AP-1 die Sortierung des Furins in unreife sekretorische Granula (ISGs). Casein-Kinase 2 (CK2)-phosphoryliertes Furin wird durch das *phosphofurin acidic cluster sorting protein-1* (PACS-1) mit AP-1 verbunden, um Furin aus den ISGs oder Endosomen zurückzugewinnen und ins TGN zu transportieren.²³ An der Zelloberfläche wird Furin durch das Zytoskelettprotein Filamin gebunden. Die Dynamin/Clathrin-vermittelte Internalisierung beginnt mit der Bindung des Tyrosinmotivs von Furin an AP-2 in frühen Endosomen. Dort kann Furin entweder durch die Protein-Phosphatase 2A dephosphoryliert und dann über die späten Endosomen in das TGN zurück transportiert werden oder durch CK-2 wieder phosphoryliert und in einem PACS-1-abhängigen Schritt wieder an die Zelloberfläche gelangen.²⁴ Das Sorting-Nexin 15 vermittelt den Transport von Furin durch die endosomalen Kompartimente.²⁵

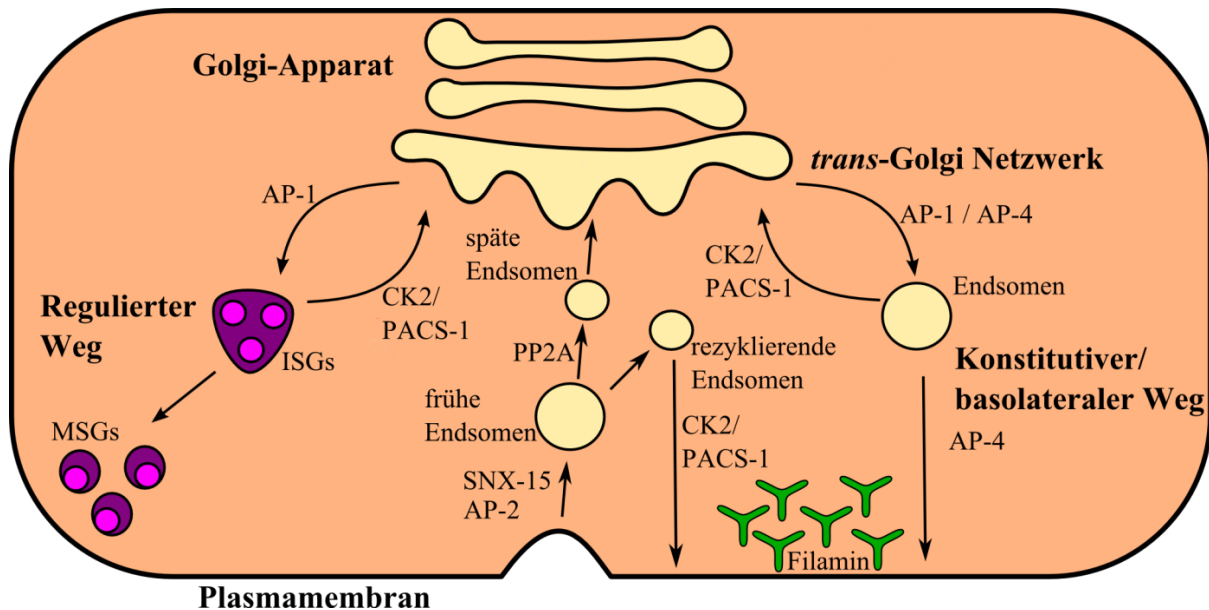


Abbildung 3: Intrazelluläre Lokalisation des Furins. Die Sortierung des Furins über den regulierten Wegs beginnt am TGN mit der Bindung an AP-1 und dem Transport zu den ISGs. Die Rückgewinnung aus den ISGs zum TGN erfolgt durch eine CK2/PACS-1-vermittelte Reaktion. Die Sortierung des Furins über den basolateralen Weg wird durch die Bindung an AP-4 vermittelt und führt zur Zelloberflächenbindung an Filamin. In einer Clathrin/Dynamin-abhängigen Reaktion wird Furin an AP-2 gebunden und wieder in die Zelle aufgenommen. Abkürzungen: AP: Adapterprotein, CK2: Casein-Kinase 2, ISG: unreife sekretorische Granula, MSG: reife sekretorische Granula, PACS: *phosphofurin acidic cluster sorting protein*, SNX-15: Sorting-Nexin 15.⁹

1.2.2. Physiologische und pathologische Prozesse

Furin katalysiert die Prozessierung vieler Proteinsubstrate und ist aufgrund seiner unterschiedlichen Lokalisierung in viele physiologische Prozesse involviert. Zu den Substraten des Furins zählen unter anderem die Vorläuferproteine der Blutgerinnungsfaktoren pro-Faktor IX und X sowie der pro-von-Willebrand Faktor und pro-Protein C.²⁶ Neben diesen Plasmaproteinen werden auch zahlreiche Proformen von Rezeptoren wie der Insulinrezeptor, das *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP) oder der Vitamin B₁₂-Rezeptor von Furin gespalten.²⁷⁻²⁹ Zu den zahlreichen Wachstumsfaktoren und Hormonen, die von Furin aktiviert werden, gehören unter anderem das pro-Parathormon, pro-Endothelin-1 oder pro-Neurotrophin-3.³⁰⁻³² Knockout-Studien in Mausmodellen führten zum embryonalen Tod nach 11 Tagen. Bei zahlreichen Faktoren, die für die Gewebsdifferenzierung in diesem Entwicklungsstadium verantwortlich sind, handelt es sich um Substrate des Furins. Hierzu zählen unter anderem TGFβ1 (*transforming growth factor*), β-NGF (*nerve growth factor*), Knochen-Morphogenese Faktoren wie BMP-4 und verschiedene Integrine wie α4-Integrin, welches in Kombination mit dem vaskulären Zell-Adhäsionsmolekül VCAM-1 Zell-Zell-Kontakte in der embryonalen Entwicklung vermittelt.³³⁻³⁷

Neben seinen physiologischen Funktionen ist Furin auch bei zahlreichen pathophysiologischen Prozessen durch die Spaltung körpereigener, aber auch zellfremder Substrate involviert. Furin aktiviert das Vorläuferprotein der β -Sekretase, die an der Bildung der β -Amyloidpeptide im Gehirn beteiligt ist.³⁸ Toxische oligomere Strukturen dieser Peptide und die daraus gebildeten Plaques sind in die Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung involviert.³⁹ Des Weiteren ist Furin sehr wahrscheinlich an der Entstehung von bestimmten Tumoren beteiligt. Erhöhte Aktivitäten des Furins und verwandter Proproteinkonvertasen konnte mit einer gesteigerten Invasivität und Malignität von Tumoren in Verbindung gebracht werden. Es wird vermutet, dass Furin eine verstärkte Aktivierung von Metalloproteasen, Angiogenese- und Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren bewirkt.⁴⁰⁻⁴³ Jedoch ist Furin auch an der Spaltung von Proteinen mit Tumorsuppressorfunktion, wie Cadherine, beteiligt.⁴⁴ In vaskulären Zellen der glatten Muskulatur und Makrophagen aktiviert Furin während arteriosklerotischer Gewebsveränderungen Integrine sowie membrangebundene Matrixmetalloproteasen. Dadurch kontrolliert es sowohl die integrinabhängige Adhäsion und Migration als auch die Signalwege in den Muskelzellen.⁴⁵

Neben den zelleigenen Vorläuferproteinen, können auch eine Reihe bakterieller und viraler Proteine durch Furin aktiviert werden (Abbildung 4). Diese Spaltung findet in unterschiedlichen Zellkompartimenten statt. Beispielsweise wird in den frühen Endosomen Diphtherie- und Shigatoxin aktiviert, während im TGN neben dem Influenza-Hämagglutininen auch Vorläuferproteine einiger Paramyxo-, Flavi- und Filoviren durch Furin gespalten werden. Dagegen erfolgt die Aktivierung des Proaerolysins und des protektiven Antigens (PA) des Anthraxtoxins durch membrangebundenes Furin an der Zelloberfläche.^{9; 46}

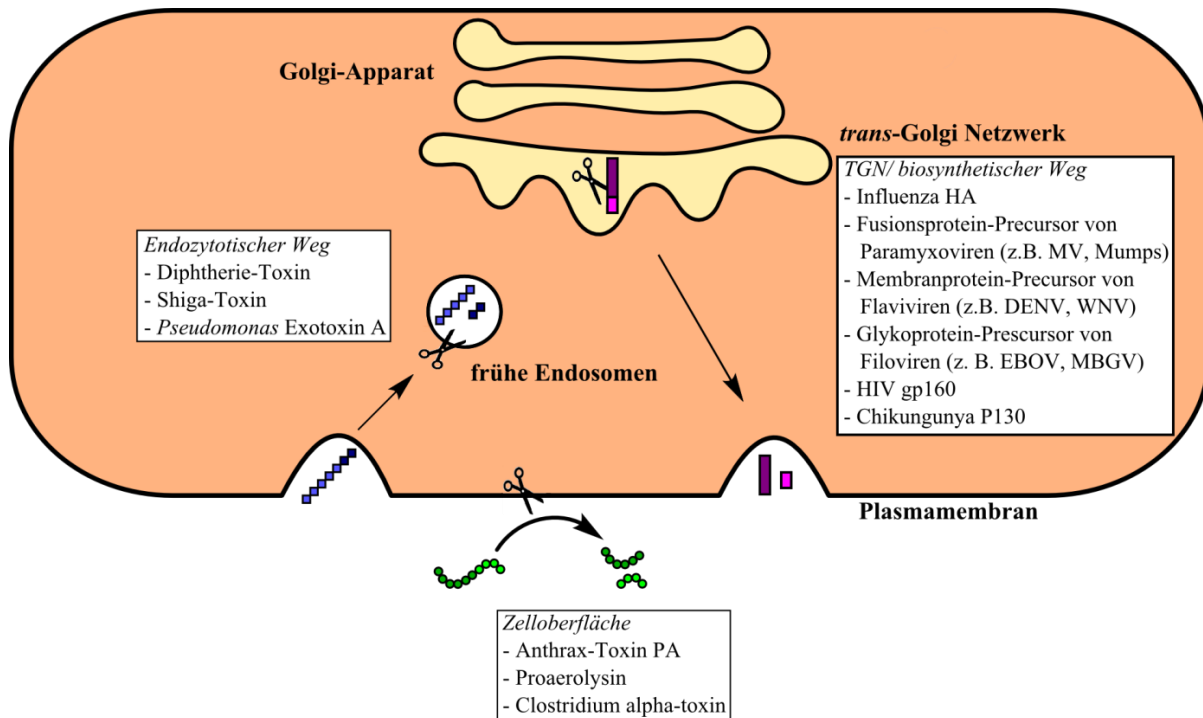


Abbildung 4: Furinkatalysierte Aktivierung viraler und bakterieller Proteine in unterschiedlichen Zellkompartimenten. An der Zelloberfläche spaltet Furin das protektive Antigen (PA) des Anthraxtoxins, Proaerolysin und α -Toxin von *Clostridium septicum*. In den leicht sauren Endosomen kommt es zur Aktivierung der Diphtherie- und Shigatoxine als auch des *Pseudomonas* Exotoxins. Furin spaltet hauptsächlich im TGN das Hämagglutinin der Influenzaviren, aber auch Glykoproteine von Masernviren.^{9; 46}

Die Beteiligung des Furins an diesen pathologischen Prozessen macht es zu einem interessanten Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Diese Hemmstoffe könnten ein neuer Ansatzpunkt zur Therapie unterschiedlicher Krankheiten sein. Da Furin und die anderen PCs auch bei vielen normalen physiologischen Prozessen beteiligt sind, könnte es bei einer zu starken Hemmwirkung über längere Zeiträume auch zu Nebenwirkungen kommen. Die Gabe eines synthetischen Furininhibitors sollte jedoch nur zu einer teilweisen Hemmung des Furins führen und bei akuten Infektionserkrankungen somit eine zeitlich begrenzte Anwendung von PC-Hemmstoffen toleriert werden.

Daher soll im Folgenden speziell auf die Rolle des Furins im Rahmen der Influenza-, Diphtherie- und Milzbrand-Infektion eingegangen werden, da hierzu mit den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren experimentelle Daten vorliegen.

1.2.2.1. Influenza

Eine Influenzainfektion wird durch RNA-Viren der Familie Orthomyxoviridae hervorgerufen, die weiter in die Gattungen A, B und C eingeteilt werden können. Eine Infektion mit Influenza-Viren der Gattung A und B kann bei Menschen zu schweren Erkrankungen mit

hohem Fieber und Reizhusten führen, während die Gattung C meist milde Krankheitsverläufe zur Folge hat. Im Fall von gesunden Erwachsenen dauert die Erkrankung etwa zwei Wochen, während bei älteren oder immunsupprimierten Menschen schwerwiegende Komplikationen, wie Lungenentzündungen, auftreten können.⁴⁷ In der Regel sterben jährlich aufgrund saisonaler Grippeausbrüche in Deutschland mehr als 1000 Menschen, wobei die Dunkelziffer vermutlich in bestimmten Jahren deutlich höher ist.⁴⁸ Neben Menschen sind zum Beispiel auch Vögel und zahlreiche andere Säugetieren von Influenza-Infektionen betroffen.⁴⁹

Zu Beginn des Vermehrungszyklus bindet das Virus über das Oberflächenprotein Hämagglutinin an sialinsäurehaltige Rezeptoren auf der Oberfläche bronchialer Wirtsepithelzellen.⁵⁰ Die niedrige Affinität des Hämagglutinins zu den Rezeptoren ($K_d > 0,1$ mM) wird durch die gleichzeitige Ausbildung multipler Bindungen ausgeglichen.⁴⁹ Anschließend wird das Virus mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen. Während der Reifung des Endosoms sinkt der pH-Wert in seinem Lumen durch die V-ATPase-Aktivität, wodurch Protonen in das Lumen der Endosomen gepumpt werden.⁵¹ Bedingt durch den niedrigen pH-Wert kommt es zu einem irreversiblen Konformationswechsel des HAs.⁵² Voraussetzung für diesen Konformationswechsel ist die vorangegangene Spaltung des Hämagglutinins (HA0) in die Untereinheiten HA1 und HA2 durch eine Wirtsprotease.⁵³ Während der Konformationsänderung kommt es zur Dissoziation der zytoplasmatischen Domäne der HA2-Untereinheit von den M1-Matrixproteinen und der Rückfaltung der HA1-Untereinheit auf der Oberfläche des Virus. Die helikalen HA2-Domänen des Homotrimers werden freigesetzt und binden mit ihrem Fusionspeptid (Reste Gly1-Leu2-Phe3-Gly4-...-Gly23 von HA2) an die Endosomenmembran.^{54; 55} Durch die Ausbildung einer haarnadelähnlichen Konformation der Fusionspeptide werden die Lipide aus der Endosomen- und Virusmembran miteinander verbunden und es kommt zur Ausbildung einer Fusionspore.^{50; 54} Es gelangen Protonen durch M2-Kanäle in das Virusinnere, wodurch die viralen Ribonukleoproteinkomplexe vom M1-Matrixprotein ablösen.⁵⁶ Die acht Minusstrang-RNA-Segmente und damit assoziierte Proteine gelangen durch die Fusionspore in das Zytosol und werden anschließend durch Importine in den Zellkern transportiert.⁵⁷ Im Zellkern findet durch viruseigene RNA-Polymerasen sowohl die Transkription der RNA in mRNA als auch die Replikation in einen Plusstrang statt, der als Matrize für die Synthese neuer viraler Minusstrang-RNA dient.⁴⁹ Die mRNA wird in das Zytosol transportiert und am rauen ER translatiert. Die neu gebildeten Virusproteine und die Minusstrang-RNA sammeln sich an der Zelloberfläche, an der durch Ausknospung (*budding*) ein neues Virus bildet. Durch das Hämagglutinin ist das Virus noch an die endständige Sialinsäure der Wirtszellrezeptoren

gebunden. Anschließend spaltet die virale Neuraminidase die Sialinsäure von den Wirtszellglykoproteinen ab und die nur schwach bindenden Sialinsäurereste diffundieren rasch vom neugebildeten Virus.⁵⁰

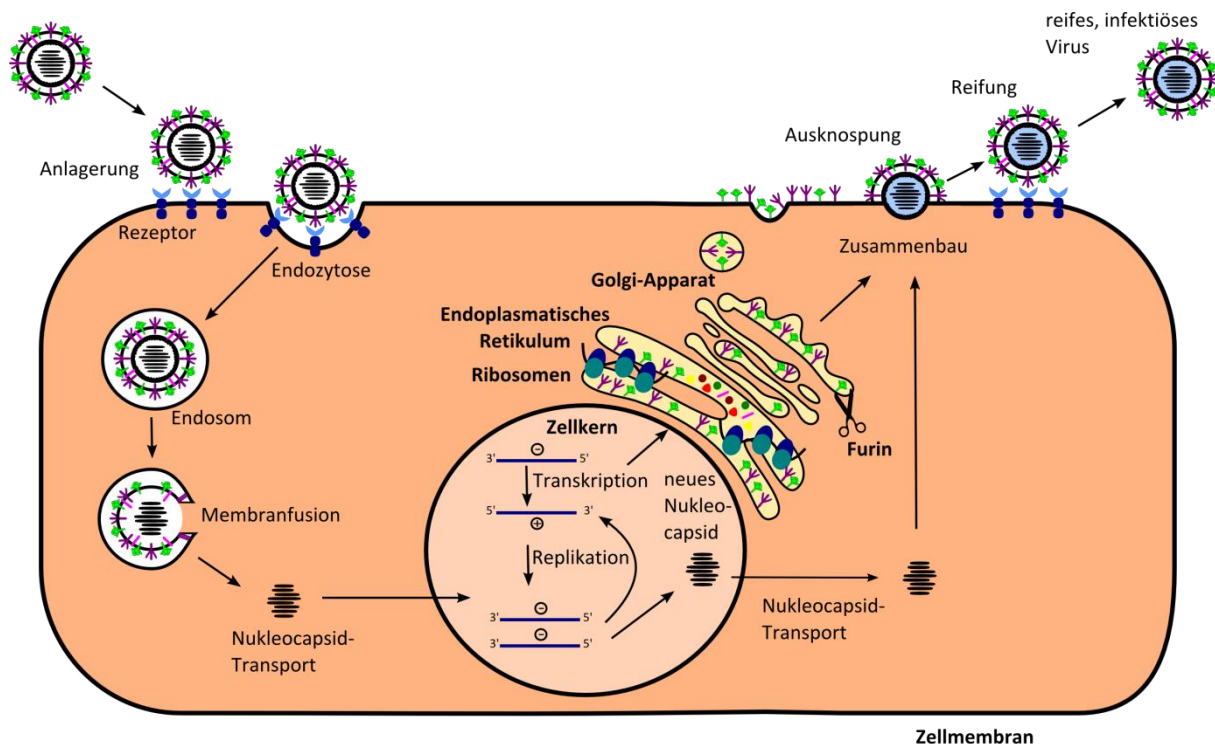


Abbildung 5: Replikationszyklus des Influenza-Virus. Zu Beginn des Vermehrungszyklus dockt das Virus über das Hämagglutinin an sialinsäurehaltige Rezeptoren auf der Zelloberfläche an. Das Virus wird endozytotisch in die Zelle aufgenommen. Durch den sauren pH im Endosom kommt es zur Konformationsänderung des Hämagglutinins und somit zur Ausbildung einer Fusionspore, durch die das virale Nukleocapsid freigesetzt wird. Im Zellkern wird die virale RNA transkribiert und repliziert. Die am rauen ER translatierten Virusproteine und das neu gebildete Nukleocapsid werden zur Zellmembran transportiert. Die Oberflächenproteine des Virus gelangen vom ER und dem Golgi-Apparat ebenfalls zur Zellmembran, an der es zur Ausknospung neuer Viren kommt. Um infektiöse Viren zu erhalten, wird das HA von HPAIV im sekretorischen Weg durch eine Wirtsprotease gespalten werden.

Die Spaltung des Vorläuferproteins des Hämagglutinins (HA0) ist, wie bereits beschrieben, Voraussetzung für die Infektiosität des Virus und erfolgt durch wirtseigene Proteasen.⁵⁸ Basierend auf den zurzeit bekannten achtzehn Hämagglutinin-Subtypen (H1 – H18) und den elf Neuraminidase-Subtypen (N1 – N11) werden die Influenzaviren in Subgruppen eingeteilt. Influenza-Viren können weiterhin in hoch- und niedrigpathogene Viren eingeteilt werden.^{54; 59} Im Fall von niedrigpathogenen aviären Influenzaviren (LPAIV) hat das HA0 eine monobasische Spaltstelle, die *in vivo* durch trypsinartige Serinproteasen wie die TMPRSS2 (*transmembrane protease serine 2*) oder die HAT (*human airway trypsin-like protease*) im Respirationstrakt des Wirts gespalten werden.^{60; 61} Aufgrund der organspezifischen Expression ist die Infektion in der Regel auf den Respirationstrakt begrenzt. Die saisonalen Influenzaviren der HA-Subtypen H1, H2 und H3 zählen zu den niedrigpathogenen

Influenzaviren, ebenso wie die pandemischen Erreger H1N1 (Schweinegrippe), H2N2 (Asiatische Grippe) oder H3N2 (Hongkong-Grippe). Im Gegensatz zum HA0 der niedrigpathogenen Viren, besitzen hochpathogene aviäre Influenzaviren (HPAIV) eine multibasische Spaltstelle, die vor allem durch die PCs Furin und PC5/6 gespalten wird.⁶² Aufgrund der weiten Verbreitung der beiden verwandten PCs in Menschen und Vögeln kann eine Spaltung des HA0 einiger Stämme der H5- und H7-Subtypen in allen Geweben erfolgen und somit zu schweren Infektionen mit hohen Mortalitätsraten führen.⁶³ Bis heute haben sich nur wenige Menschen mit HPAIV infiziert. Ein Grund hierfür sind unterschiedliche sialinsäurehaltige Rezeptoren in den verschiedenen Spezies.⁵⁰ Influenzaviren binden in Vögeln an Sialinsäuren, die α -2,3-glykosidisch mit Galaktose verknüpft sind, während im Menschen Rezeptoren vorhanden sind, an denen die Sialinsäure α -2,6-glykosidisch verknüpft ist.⁴⁹ Aufgrund des Auftretens beider Rezeptortypen in Tracheazellen von Schweinen besteht im Fall einer Koinfektion die Gefahr einer Reassortierung, wodurch ein neues pandemisches Virus gebildet werden kann.⁶⁴

Die jährliche Impfung ist die wichtigste Präventionsmaßnahme gegen eine mögliche Grippeinfektion. Aufgrund der hohen Mutationsrate der Influenzaviren ist eine jährliche Anpassung an die auftretenden Virusstämme notwendig und die Impfung sollte für Risikogruppen jährlich erfolgen. Unter Berücksichtigung der auftretenden Fälle gibt die WHO im Frühjahr eine Empfehlung an die Hersteller für die Zusammensetzung des Impfstoffs heraus.⁶⁵ Die Produktion dauert etwa ein halbes Jahr, so dass der Impfstoff im Herbst verfügbar ist. Im Fall einer plötzlich auftretenden Pandemie ist diese lange Produktionszeit problematisch, da zunächst kein Impfstoff verfügbar ist, was 2009 bei der Schweinegrippe der Fall war. Universalimpfstoffe, die gegen generell vorkommende Antigen-Epitope gerichtet sind und somit gegen alle Influenzasubtypen eingesetzt werden könnten, sind zurzeit in der Entwicklung.⁵⁹ Für die Behandlung einer akuten Influenzainfektion stehen in Deutschland zwei Arzneistoffklassen zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um die Neuraminidasehemmer Oseltamivir (Tamiflu[®], Roche) und Zanamivir (Relenza[®], GlaxoSmithKline) sowie der nur noch selten gegen Influenza-A-Viren eingesetzte M2-Protonenkanalinhibitor Amantadin. Für die zugelassenen Virostatika ist eine zunehmende Resistenzrate zu beobachten.⁶⁶ Durch eine Mutation der Neuraminidase (H274Y) des Subtyps H1N1 traten 2007 vermehrt Oseltamivir-Resistenzen auf. Der Anteil der resistenten Viren zeigt saisonale Unterschiede, so waren zum Beispiel in 2008/2009 etwa 90 % der Viren resistent gegenüber Oseltamivir, während in der folgenden Saison eine geringere Resistenzrate zu beobachten war.⁶⁷ Die zunehmende Ausbildung von Resistenzen könnte

vermieden werden, wenn statt viraler Enzyme wirtseigene Zielstrukturen, wie die HA-spaltende Proteasen, gehemmt werden.

1.2.2.2. Hundestaupe

Hundestaupe ist eine infektiöse Viruserkrankung, die durch das canine Staupe-Virus (*canine distemper virus*, CDV) hervorgerufen wird und unter anderem die Familien Canidae, Mustelidae oder auch Hyanidae betrifft.⁶⁸ Das CDV besitzt eine Einzelstrang-RNA mit negativer Polarität und zählt, ebenso wie das humanpathogene Masernvirus oder das Rinderpestvirus, zur Familie der Paramyxoviridae und hier speziell zu den Morbilliviren. Menschen erkranken in der Regel nicht an Hundestaupe, in einigen wenigen Fällen konnten allerdings anti-CDV Antikörper in Menschen nachgewiesen werden, was ein Indiz für eine vorangegangene Infektion sein kann.⁶⁹ In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass eine Anpassung an menschliche Zellrezeptoren innerhalb weniger Replikationszyklen möglich ist. Um sich in der menschlichen Zelle reproduzieren zu können, müssten allerdings noch weitere Mutationen stattfinden.⁷⁰

Das Virus wird in der Regel durch eine Tröpfcheninfektion übertragen und befällt zunächst den lymphatischen Rachenring sowie die bronchialen Lymphknoten. Durch infizierte Lymphozyten und Makrophagen gelangen die Viren in weitere lymphoretikuläre Organe wie Milz, Thymus und Knochenmark, in denen es zu einer massiven Replikation der Viren kommt. Zu den ersten Symptomen zählen Fieber, Dehydrierung und Lethargie. Im Verlauf der Infektion kann es zu einer Leukoenzephalomyelitis und einer daraus resultierenden Demyelinisation der Nervenzellen kommen.^{68; 71}

Dauer und Verlauf einer Hundestaupeinfektion variieren stark und hängen sowohl vom Alter und der Immunkompetenz des erkrankten Tiers als auch vom Virusstamm ab.

Die Infektion beginnt, wie in Abbildung 6 gezeigt, mit der Bindung eines tetrameren Komplexes aus sogenannten H-Proteinen auf der Virusoberfläche an Wirtszellrezeptoren wie *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin* (DC-SIGN), *cluster of differentiation 150/signaling lymphocyte activation molecule* (CD150/SLAM) oder *cluster of differentiation 46* (CD46). Es wird angenommen, dass durch diese Bindung eine Konformationsänderung des H-Proteins erfolgt, wodurch das Fusionsprotein (F-Protein) ebenfalls die Konformation ändert und sich somit über eine Distanz von mehreren Nanometern an die Wirtszellmembran anlagert. Durch Umlagerungen im F-Protein kommt es

zur Porenbildung, durch die das Virus in die Wirtszelle gelangt.⁷² Dieser Konformationswechsel wird nur dann möglich, wenn Furin das Vorläuferprotein des trimeren F-Proteins F_0 in die Untereinheiten F_1 und F_2 im vorangegangenen Replikationszyklus im TGN gespalten hat.⁷³ Direkt nach der Aufnahme in die Zelle kommt es zur Transkription des viralen Minusstrang-RNA-Genoms durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase, die mit dem Genom assoziiert ist. Die virale mRNA wird am rauen ER translatiert und die neu gebildeten Virusproteine sammeln sich an der Zelloberfläche. Durch die Polymerase findet auch die Replikation in einen Plusstrang statt, der als Matrize für die Synthese neuer Minusstrang-RNA dient. Das virale Genom wandert wie die viralen Proteine zur Zelloberfläche, an der durch Ausknospung von der Wirtzellmembran ein neues Virus entsteht.⁷⁴

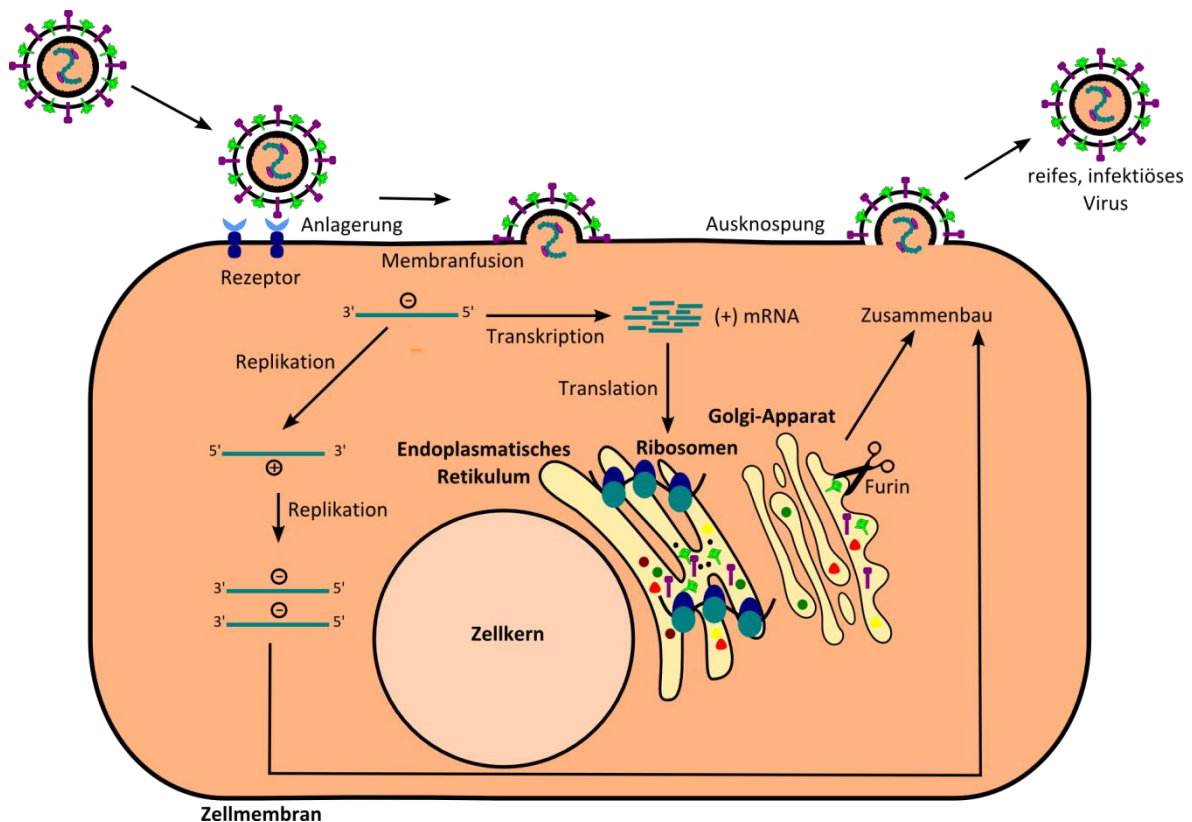


Abbildung 6: Replikationszyklus des Hundestaupervirus. Zu Beginn des Vermehrungszyklus dockt das Virus über das H-Protein (in lila) an Wirtszellrezeptoren auf der Zelloberfläche an. Nach der Membranfusion über das F-Protein (grün) gelangt die virale RNA in das Zytosol, in dem die Transkription und Replikation stattfindet. Die translatierten Virusproteine und das neu gebildete Genom werden zur Zellmembran transportiert. Die Oberflächenglykoproteine des Virus gelangen vom ER und dem Golgi-Apparat ebenfalls zur Zellmembran, an der es zur Ausknospung eines neuen Virus kommt.

Eine Impfung ist die wichtigste Präventionsmaßnahme gegen eine mögliche Staupeinfektion. Spezifische Arzneistoffe stehen bisher noch nicht zur Verfügung. Im Krankheitsfall erfolgt in der Regel eine symptomatische Therapie, oft werden auch Antibiotika verabreicht, um mögliche Sekundärinfektionen zu vermeiden.⁷¹

1.2.2.3. Anthrax

Anthrax, auch Milzbrand genannt, ist eine weltweit auftretende Zoonose, die durch eine Infektion mit *Bacillus anthracis* ausgelöst wird, einem grampositiven, sporenbildenden, obligat aeroben Stäbchen, das hauptsächlich im Erdboden vorkommt. Es befällt vorwiegend Herbivoren, die sich bei der Nahrungsaufnahme infizieren. Menschen infizieren sich in der Regel durch Kontakt mit erkrankten Tieren oder tierischen Produkten, die mit dem Bakterium oder seinen Sporen kontaminiert sind. Eine Übertragung der Erkrankung von Mensch zu Mensch gilt als eher unwahrscheinlich.⁷⁵

Die Virulenz von *Bacillus anthracis* hängt vom Vorhandensein von zwei Plasmiden, pX01 und pX02, ab.⁷⁵ Bakterienstämme, in denen ein oder beide Plasmide fehlen, sind weniger oder gar nicht virulent. pX01 enthält die Gene für Komponenten des vom Bakterium freigesetzten Toxins. Auf dem Virulenzplasmid pX02 sind die Gene für die Poly-D-Glutaminsäurekapsel kodiert. Die Bildung dieser Kapsel hat zur Folge, dass die Phagozytose des Bakteriums durch Zellen des Immunsystems ausbleibt und somit keine Immunreaktion des Wirtes erfolgt. Im Folgenden soll speziell auf die Wirkung des Anthraxtoxins eingegangen werden. Es handelt sich um ein binäres Toxin, welches aus drei vom Bakterium sekretierten Proteinen besteht, dem sogenannten protektiven Antigen (PA), dem Ödem-Faktor (EF) und dem Letal-Faktor (LF).⁷⁶ PA ist die Komponente, die für die Aufnahme des Toxins in die Zelle verantwortlich ist. Im ersten Schritt bindet das 83 kDa schwere Vorläuferprotein PA₈₃ an die nahezu ubiquitär vorkommenden Rezeptoren *capillary morphogenesis protein 2* (CMG2) oder *tumor endothelium marker 8* (TEM8) (Abbildung 7). Dort wird durch Furin oder eine verwandte PC nach dem Motiv R164-K-K-R167 ein 20 kDa schweres Segment (PA₂₀) vom N-Terminus abgespalten.^{77; 78} Das verbliebene PA₆₃ bleibt an den Rezeptor gebunden und bildet mit anderen rezeptorgebundenen PA₆₃-Molekülen einen ringförmigen heptameren Komplex, der als sogenannte Präpore bezeichnet wird. Diese Präpore kann drei Moleküle LF und/oder EF binden und durch Clathrin-vermittelten Transport unter Bildung eines frühen Endosoms in die Zelle einschleusen. Der saure pH-Wert im Inneren des Endosoms führt zu einer Konformationsänderung des Heptamers, so dass die Präpore in der Membran eine Pore formt. Durch diesen kationenselektiven Kanal gelangen die jeweils ungefalteten LF und EF in das Zytosol, wo sie ihre aktive Faltung einnehmen und damit ihre enzymatische Aktivität erlangen. EF ist eine 89 kDa schwere Calcium- und Calmodulin-abhängige Adenylatzyklase, die eine Akkumulation von zyklischem AMP (cAMP) im Zytosol auslöst. Durch diese Anreicherung werden sowohl die Wasserhomöostase als auch die Signalwege in der Zelle

beeinflusst. LF ist eine hochspezifische zinkabhängige Metalloprotease, die die Spaltung und damit einhergehende Inaktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinasen (MAPKKs) katalysiert, die Bestandteil des sogenannten MAPK-Signalwegs sind. Durch ihre Inaktivierung kommt es zu einer Blockade zellulärer Signalwege und letztlich zur Apoptose.⁷⁶ Eine Aktivierung des Immunsystems wird durch die Hemmung der Freisetzung von Zyto- und Chemokinen, wie dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) oder Interleukin-1 β (IL-1 β), verhindert. Dies führt in der Regel dazu, dass frühe Anzeichen einer Infektion fehlen und oft zu spät mit einer Therapie begonnen werden kann.⁷⁹

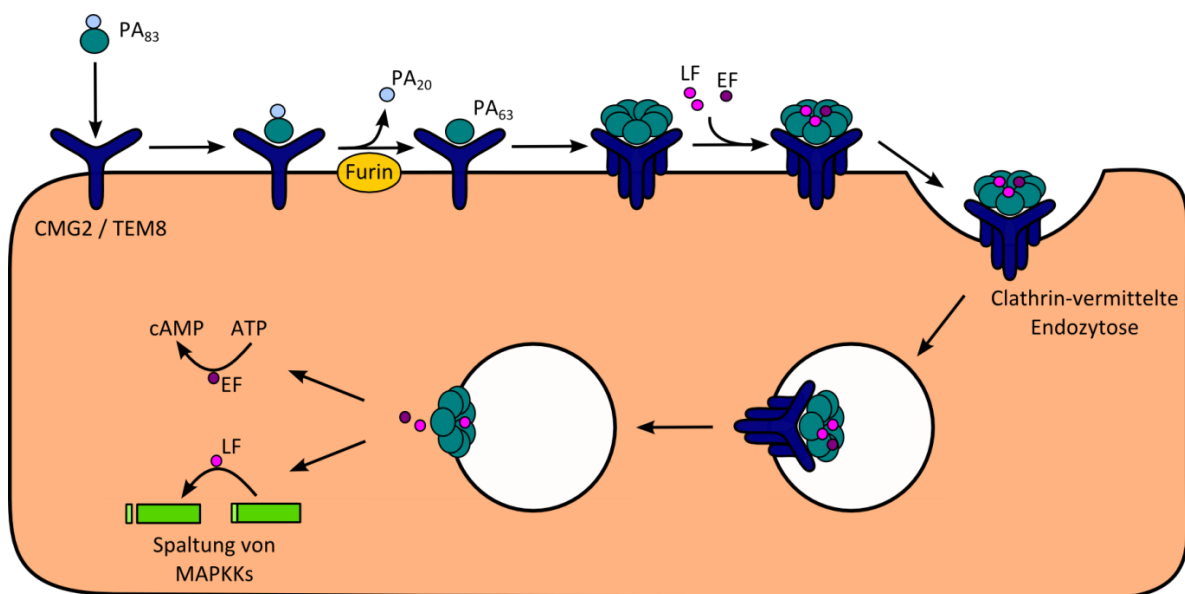


Abbildung 7: Schematischer Wirkmechanismus des Anthraxtoxins. Das Vorläuferprotein PA₈₃ bindet an die Rezeptoren CMG2 oder TEM8. Durch Furin kommt es unter Abspaltung eines 20 kDa Fragments zur Aktivierung des PA, welches in der aktivierten Form einen heptameren Komplex ausbildet, an den bis zu drei Moleküle LF und/oder EF binden können. Durch Clathrin-vermittelte Endozytose wird dieser Komplex in die Zelle aufgenommen. Aufgrund des niedrigen pH-Werts in den Endosomen bildet sich eine Pore, durch die LF und EF in das Zytosol gelangen. EF katalysiert die vermehrte Bildung von cAMP und LF inaktiviert MAPKKs.⁷⁸

Je nach Infektionsort unterscheidet man Haut-, Lungen- und Darmmilzbrand.⁷⁵ Hautmilzbrand ist die häufigste, aber in der Regel ungefährlichste Variante, bei der etwa 5 – 20 % der Infektionen unbehandelt zum Tod führen. In diesem Fall dringt der Erreger oder seine Sporen durch eine Hautverletzung in den Körper ein. Nach etwa 2 - 3 Tagen bildet sich lokal ein karbunkelähnlicher Infektionsherd, von dem es zu einer blitzartig verlaufenden Septikämie kommen kann wodurch auch eine Infektion weiterer Organe möglich ist. Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Hautmilzbrand ist der sogenannte Lungenmilzbrand die prognostisch ungünstigste Variante. Die Inkubationszeit kann von einigen Tagen bis zu mehreren Wochen reichen. Die Krankheit beginnt mit unspezifischen, grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Husten, Schüttelfrost oder Atemnot. Trotz sofortiger antibiotischer

Therapie liegt die Mortalitätsrate bei 50 % und der Tod tritt in der Regel innerhalb von drei bis sechs Tagen in Form eines septischen Schocks ein. Der sogenannte Darmmilzbrand ist die seltenste Form, wobei die Infektion durch den Verzehr von sporenhaltigen Lebensmitteln erfolgt. Die Inkubationszeit beträgt hier von wenigen Stunden bis zu etwa drei Tagen. Erste Anzeichen einer Erkrankung sind Erbrechen und blutige Diarrhö. Im schlimmsten Fall können sich die Keime im Körper verteilen und zu einer Sepsis führen, zu deren Folgen Herz- und Nierenversagen zählen können. Die Therapie von Milzbrand sieht die sofortige Antibiotikagabe vor. In der Regel werden hier Fluorchinolone, Doxycyclin, Erythromycin oder Penicillin G angewendet.⁷⁵ Trotz sofortiger Therapie kann eine Infektion jedoch letal sein, da durch die Antibiotikagabe zwar das bakterielle Wachstum gehemmt wird, aber die Wirkung der Toxine nicht mehr aufgehalten werden kann. Seit Dezember 2012 ist der monoklonale Antikörper Raxibacumab (GlaxoSmithKline) zur Behandlung von Lungenmilzbrand zugelassen. Dieser Antikörper ist gegen PA gerichtet, wodurch die Toxin-Aufnahme in die Zelle verhindert wird.⁸⁰

1.2.2.4. Diphtherie

Friedrich Loeffler identifizierte 1884 das *Corynebacterium diphtheriae* als Erreger der akuten und ansteckenden Infektionskrankheit Diphtherie.⁸¹ Bei *Corynebacterium diphtheriae* handelt es sich um ein aerobes, unbewegliches, grampositives Stäbchen. Infektionen werden weltweit beobachtet, allerdings hat sich in den letzten 50 - 75 Jahren das Muster des Auftretens verändert. In den westlichen Industrieländern ist die Zahl der Erkrankungen aufgrund der verfügbaren Impfung deutlich zurückgegangen. Die letzte große Epidemie in Deutschland erreichte ihren Höhepunkt in den 40er Jahren. In Ländern der ehemaligen Sowjetunion und auf dem indischen Subkontinent tritt die Erkrankung immer noch endemisch auf.⁸²

Diphtherie kann von Mensch zu Mensch durch Tröpfchen- oder Schmierinfektionen übertragen werden. Je nach Immunlage des Betroffenen treten die ersten Symptome wie Halsschmerzen und Fieber zwei bis sechs Tage nach der Infektion auf. Die Diphtherie kann in Mandel-, Rachen-, Kehlkopf- und Hautdiphtherie unterschieden werden, wobei Infektionen des Rachenraums am häufigsten auftreten. Im Verlauf der Infektion kommt es zu Lymphknotenschwellungen und zur Ausbildung von Pseudomembranen aus abgestorbener Schleimhaut und Blut im Rachenraum.⁸³ Besonders gefährlich sind Komplikationen, wie zum Beispiel Myokarditis, Polyneuritis oder Pneumonie, die im Rahmen der Erkrankung auftreten

können und oft den Tod des Patienten zur Folge haben.⁸³ Trotz Therapie ist die Diphtherie in ca. 10 % der Infektionen tödlich. Im Fall einer falschen Behandlung steigt die Letalität sogar auf bis zu 25 %.⁸²

Ähnlich wie bei Anthraxtoxin entsteht die Virulenz durch ein Toxin, das von dem Bakterium sekretiert wird. Auch in diesem Fall wird das Toxin nur von Bakterien produziert, die mit spezifischen Corynebakterien infiziert sind. Nichttoxigene *Corynebacterium diphtheriae* verursachen nur äußerst selten lokale Läsionen, können die Fähigkeit Diphtherietoxin zu bilden aber durch eine Infektion mit den Bakteriophagen erwerben.⁸⁴ Diphtherietoxin ist ein AB-Toxin, das aus zwei Fragmenten besteht. Bei dem sogenannten Fragment A handelt es sich um die katalytische Domäne und Fragment B setzt sich aus einer Transmembran-Domäne sowie einer rezeptorbindenden Domäne zusammen.⁸¹ Die Intoxikation beginnt, wie in Abbildung 8 dargestellt, mit der Bindung des Proteins über die rezeptorbindende Domäne an den Heparin-bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktor (HB-EGF) und den Cofaktor CD9. Das Toxin wird im Folgenden durch Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. Im sauren Milieu der Endosomen werden die beiden Toxinfragmente durch Furin hinter der Sequenz R190-V-R-R193 gespalten, wobei die beiden Komponenten über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben.⁸⁵ Die Transmembran-Domäne ermöglicht durch die Bildung einer Pore den Transport der katalytischen Domäne in das Zytosol, wo durch die Thioredoxin-Reduktasen die Disulfidbrücke gespalten wird. Nach einem Konformationswechsel wird die katalytische Domäne zu einer ADP-Ribosyltransferase, die den Elongationsfaktor 2 (EF-2) ADP-ribosyliert. EF-2 ist für den GTP-abhängigen Translokationsschritt des Ribosoms verantwortlich, seine ADP-Ribosylierung bewirkt eine Hemmung der Proteinsynthese in der Zelle.^{81; 86}

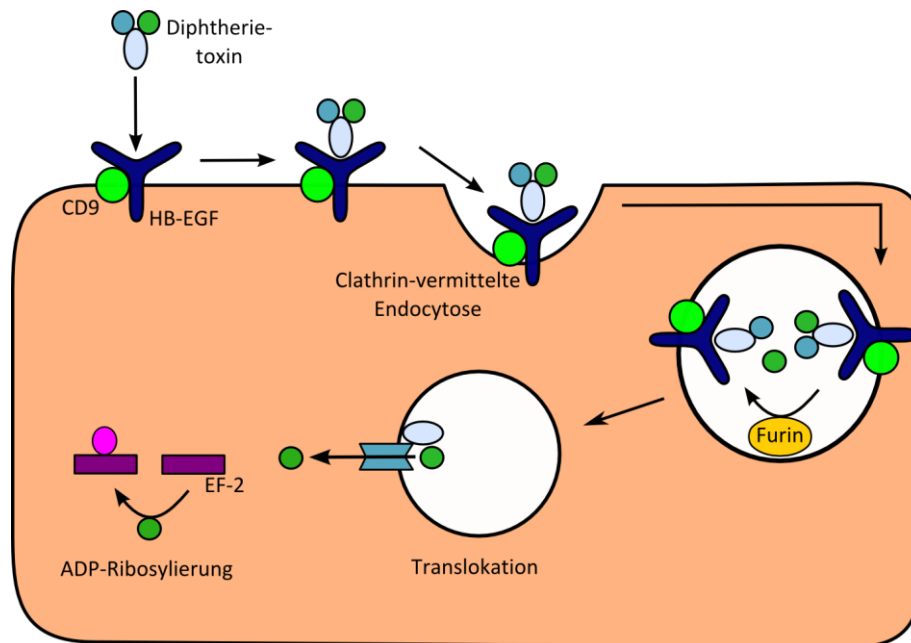


Abbildung 8: Schematischer Wirkmechanismus des Diphtherietoxins. Das vom Bakterium sekretierte Toxin bindet an den Rezeptor HB-EGF in Gegenwart des Cofaktors CD9 und wird durch Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. In den Endosomen werden die beiden Toxinkomponenten durch die furinkatalysierte Spaltung freigesetzt. Die eine Untereinheit führt zur Porenbildung und die andere Untereinheit gelangt durch die Pore in das Zytosol der Zelle, wo sie die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 (EF-2) bewirkt. Die rezeptorbindende Untereinheit und die Transmembrandomäne des B-Fragments sind in hellblau und blau dargestellt und das A-Fragment in dunkelgrün.⁸⁷

Die Behandlungsstrategie im Fall einer akuten Infektion sieht die sofortige Gabe eines Antitoxins vor, welches das noch extrazellulär zirkulierende Toxin bindet und somit neutralisiert. Neben dem Antitoxin werden zusätzlich Antibiotika wie Penicillin oder Erythromycin verabreicht, um die Zahl der toxinproduzierenden Bakterien zu verringern.⁸²

1.2.3. Kristallstruktur des Furins

Eine Kristallstruktur murinen Furins im Komplex mit dem irreversibel hemmenden Inhibitor Dec-RVKR-CMK (Abschnitt 1.2.4.2) konnte erstmals 2003 mit einer Auflösung von 2,6 Å gelöst werden (PDB: 1P8J).¹⁹ Für die Kristallisation wurde eine verkürzte Form des Maus-Furins verwendet, die nur die Protease- und die P-Domäne des Enzyms umfasst. Der Aufbau der Proteasedomäne ähnelt dem bakteriellen Subtilisin und besteht aus einem anti-parallelen und sieben parallelen Faltblattstrukturen sowie sieben α -Helices. Bei dem für die Kristallisation verwendeten Inhibitor handelt es sich um ein Chloromethylketon-Derivat, das Furin und verwandte PCs effektiv hemmt.⁸⁸ Unter Ausbildung eines Hemiketals greift das katalytische Ser368 den Carbonyl-Kohlenstoff am P1-Rest des CMK-Inhibitors an, wodurch der Carbonyl-Kohlenstoff einen tetraedrischen Zustand einnimmt, der dem Übergangszustand der enzymkatalysierten Reaktion ähnelt.⁸⁹ Das Histidin der katalytischen Triade wird

daraufhin irreversibel durch die Methylengruppe alkyliert. In der Kristallstruktur konnten zwei Disulfidbrücken und zwei Bindestellen für Ca^{2+} -Ionen identifiziert werden, wobei sich eine Ca^{2+} -Bindestelle direkt unterhalb der S1-Tasche befindet. Dieses Ca^{2+} -Ion wird pentagonal-bipyramidal durch die Seitenketten der Aminosäuren Asp258, Glu331 (2x) und Asp301 sowie von drei Wassermolekülen koordiniert, wodurch die Konformation der S1-Tasche stabilisiert wird.¹⁹ Die Argininseitenkette in Position P1 wird auf der einen Seite der S1-Tasche von dem Segment Ser253 – Asp258 und auf der anderen Seite von dem Segment Ser293 – Asn295 umgeben. Die P1-Guanidinofunktion interagiert mit den Carboxylatgruppen von Asp258 und Asp306 sowie dem Carbonyl-Sauerstoff von Pro256 und Ala292 (Abbildung 9).¹⁹ Hieraus erklärt sich die strikte Substratspezifität für Arginin als P1-Rest, da diese Wechselwirkungen mit einer Lysin-Seitenkette nicht möglich sind. Die Aminogruppe in der Seitenkette des P2-Lysins bindet an einen Carboxyl-Sauerstoff des Asp154, an das Carbonsäureamid des Asn192 sowie an den Carbonyl-Sauerstoff des Asp191. In Position P3 des Inhibitors befindet sich Valin, dessen Rückgrat zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu Gly255. Von der Seitenkette des P3-Rests werden nur einige intra- und intermolekulare Wechselwirkungen ausgebildet. Die Guanidinogruppe des P4-Arginins formt Salzbrücken mit den Seitenketten des Glu236 und Asp264 und interagiert mit der Hydroxylgruppe des Tyr308 und dem Carbonylsauerstoff des Gly265. Der Carbonyl-Sauerstoff des P5-Decanoyl-Rests bildet eine intramolekulare Wechselwirkung mit der P4-Guanidinogruppe aus und bindet über ein verbrückendes Wassermolekül an das Rückgrat-Amid des Glu257. Die Alkylkette des Decanoylrests ist in das Lösungsmittel gerichtet.

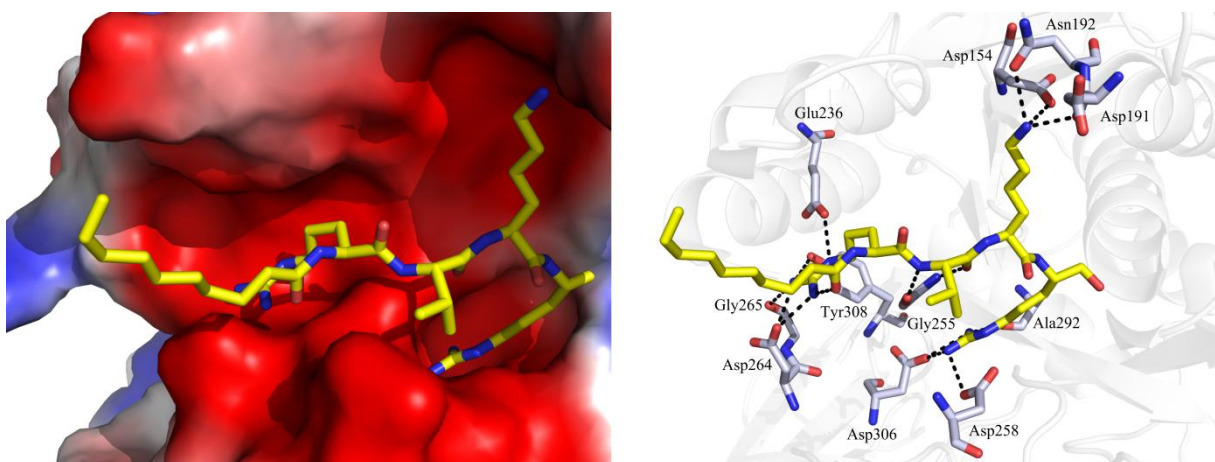


Abbildung 9: Komplex des irreversibel hemmenden Inhibitors Dec-RVKR-CMK im aktiven Zentrums des mFurins. Der Inhibitor ist im Stab-Modell dargestellt (Kohlenstoff gelb, Stickstoff blau und Sauerstoff rot). Links: Darstellung des Inhibitors vor der Oberfläche der katalytischen Domäne, die entsprechend ihrer berechneten negativen (- 66,207 kT/e, rot) und positiven (+ 66,207 kT/e, blau) elektrostatischen Potentiale eingefärbt wurde. Rechts: Darstellung der Wechselwirkungen zwischen dem Inhibitor und dem aktiven Zentrum. Die Furinreste die Wechselwirkungen mit dem Inhibitor eingehen sind im Stab-Modell abgebildet (Kohlenstoff grau, Stickstoff blau und Sauerstoff rot). Das *backbone* des Furins ist aus Gründen der Übersichtlichkeit im Cartoon-Style dargestellt. Die ausgebildeten Wechselwirkungen sind als gestrichelte schwarze Linien gezeigt.

1.2.4. Furininhibitoren

Die bisher bekannten Furininhibitoren lassen sich nach ihrem Molekulargewicht in Makromoleküle, Peptidderivate sowie nicht-peptidische Verbindungen einteilen. Die Inhibitoren jeder Gruppe können sich in den funktionellen Gruppen, Strukturen und Inhibierungsmechanismus unterscheiden. Tabelle 2 zeigt eine Auswahl bisher publizierter Verbindungen.^{90; 91}

Tabelle 2: Klassifizierung der Furininhibitoren in Makromoleküle, Peptide und nicht-peptidische Inhibitoren.

| Makromoleküle | peptidische Inhibitoren | nicht-peptidische Inhibitoren |
|---|--------------------------------|--------------------------------------|
| <i>α_1-antitrypsin Portland</i> | Chlormethylketon-Derivate | Dideoxystreptamin-Derivate |
| <i>turkey ovomucoid third domain</i> | Ketomethylen-Derivate | Guanylhyazone |
| Inter- α -inhibitor Protein | Derivate der Prodomäne | Naphthofluorescein |
| Eglin C Mutante M2 | Peptide aus Screenings | Dicoumarol-Derivate |
| α_2 -Macroglobulin | | Kupfer- oder Zink-Chelatkomplexe |
| Proteinaseinhibitor 8 | | Diterpene |
| Nanokörper | | |

1.2.4.1. Makromolekulare Inhibitoren

Bei den makromolekularen Furinhemmstoffen handelt es sich im Wesentlichen um Verbindungen, die sich von bereits bekannten Proteaseinhibitoren ableiten. Durch das Einfügen einer Furinspaltstelle konnten zahlreiche wirksame Furininhibitoren, wie *α_1 -antitrypsin Portland* (α_1 -PDX), *turkey ovomucoid third domain* (OMTKY3) oder Inter- α -inhibitor Protein (I α Ip), entwickelt werden.

Im Fall des α_1 -PDX wurde die natürliche Erkennungssequenz A355-I-P-M358 durch R355-I-P-R358 ersetzt und dadurch ein Suizidinhibitor mit einem IC₅₀-Wert von 0,6 nM für Furin erhalten.⁹² Durch die Expression des α_1 -PDX in Zellkulturen konnte sowohl die Prozessierung des HIV-Vorläuferproteins gp160 als auch die Virusfusion mit der Wirtszelle im Fall einer Maserninfektion gehemmt werden.^{93; 94} Von der inhibitorischen Schleife des α_1 -PDX wurden verschiedene lineare und zyklische mini-PDX-Derivate abgeleitet. Die beiden wirksamsten 30-Aminosäure langen Derivate hemmen Furin mit IC₅₀-Werten von 731 nM beziehungsweise 569 nM.⁹⁵ OMTKY3 gehört zur Familie der Kazal-Inhibitoren und ist als ein starker Hemmstoff von Serinproteasen bekannt, die nach neutralen Resten in der P1-Position spalten. Durch Austausch der Sequenz A15-C-T-Leu18 mit R15-C-L-R18 wurde ein moderat wirksamer Furininhibitor mit einer Assoziationskonstante K_a von $1,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ erhalten.⁹⁶

I α Ip wurde aus humanem Plasma isoliert. Es handelt sich um einen Komplex, der aus zwei schweren und einer leichten Kette, die über einen Chondroitin-Linker miteinander verbunden sind, besteht. Der genaue Hemmmechanismus ist nicht bekannt. Vermutlich ist die leichte Kette, die als Bikunin bezeichnet wird und zwei kunitzartige Inhibitor-domänen enthält für die Furinhemmung verantwortlich. Sowohl in Zellkulturversuchen als auch in Mausexperimenten führte die Behandlung mit I α Ip zu einem signifikanten Schutz gegen Anthraxtoxin.^{97; 98} Eglin C wurde zuerst aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* isoliert und gehört zur Familie der sogenannten *potato-I*-Inhibitoren. Es hemmt zahlreiche Serinproteasen, wie Subtilisin, humane Leukozytenelastase, oder Cathepsin G. Der Einbau einer Furinerkennungssequenz durch Austausch des Segments P42-V-T-L45 mit R42-V-K-R45 führte zu einem wirksamen Furininhibitor mit einem K_i-Wert von 1,6 nM.^{99; 100} Das homotetramere Glykoprotein α_2 -Macroglobulin (α_2 -M), kommt in hohen Konzentrationen in Blut vor und ist ein wirksamer Inhibitor zahlreicher Proteasen. Nach Spaltung durch die Zielpotease innerhalb der sogenannten *bait region*, hydrolysieren die Thioester zwischen einer Cystein- und einer Glutamyseitenkette und lösen eine Konformationsänderung von α_2 -M aus, die den Einschluss der Protease durch α_2 -M zur Folge hat.¹⁰¹ Durch Einfügen des Segments R683-S-K-R-S-L688 anstelle von G683-F-Y-E-S-D688 wurde ein potenter Furinhemmstoff erhalten, der die Spaltung des von-Willebrand Faktors, TGF- β 1 und des gp160 von HIV hemmt.¹⁰²

Der 45-kDa schwere Proteinaseinhibitor 8 (PI8) ist ein natürlich vorkommendes Serpin vom Ovalbumin-Typ und enthält die P4 - P3' Furinerkennungssequenz R336-N-S-R339 und R339-C-S-R342. Die Hemmung des Furin durch PI8 ist ein zweistufiger Prozess. Zunächst kommt es zu einer schnellen Ausbildung eines initialen Komplexes, gefolgt von einer langsamen Isomerisierung in eine stabilere Form. Für Furin wurde ein K_i-Wert von 53,8 pM bestimmt.¹⁰³ Ein neuer Ansatz in der Entwicklung von Furininhibitoren ist die Verwendung von spezifischen Nanokörpern. Diese leiten sich von antigenbindenden Fragmenten des Dromedars ab und hemmen Furin allosterisch mit K_i-Werten im Bereich von 20 – 30 μ M. In *in vitro* Studien zeigten diese Nanokörper eine Hemmung der Spaltung des Diphtherie- und des Anthraxtoxins.¹⁰⁴

1.2.4.2. Peptidische Inhibitoren

Irreversibel bindende Chloromethylketon-Inhibitoren waren die ersten wirksamen Hemmstoffe furinartiger PCs.^{105; 106} Die am häufigsten verwendete Verbindung ist das

kommerziell erhältliche Chloromethylketon-Derivat Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CMK (**1**, siehe Abbildung 10), das alle furinartigen PCs sehr wirksam hemmt.^{88; 92} In Zellkultur konnte mit dieser Verbindung die furinkatalysierte Spaltung des gp160 von HIV gehemmt werden.¹⁰⁶ Im Komplex mit diesem Inhibitor wurde eine erste Kristallstruktur des murinen Furins gelöst (Abbildung 9).¹⁹ Chloromethylketone sind jedoch für eine Wirkstoffentwicklung ungeeignet. Studien mit dem Thrombin-Inhibitor D-Phe-Pro-Arg-CMK zeigten eine sehr kurze Halbwertszeit dieser Verbindung von < 5 min *in vivo*.¹⁰⁷ Das P4 – P1-Segment des Chloromethylketons **1** wurde jedoch als Grundlage für die Entwicklung weiterer peptidischer Inhibitoren genutzt. Beispielsweise hemmt das Ketomethylen-Derivat **2** Furin mit einem K_i -Wert von 3,4 nM.¹⁰⁸

Weitere peptidische Inhibitoren des Furins wurden von der Prodomäne des Furins abgeleitet. Wie bereits erwähnt, wird Furin als Zymogen synthetisiert und durch eine in zwei Schritten erfolgende autokatalytische Abspaltung der Prodomäne aktiviert. Das Prosegment dient als intramolekulares Chaperon, das sowohl für die korrekte Faltung und den Transport in die zellulären Kompartimente verantwortlich ist, als auch für die Regulierung der enzymatischen Aktivität. Der K_i -Wert für die vollständige Prodomäne aus 83 Aminosäuren ist 156 nM.¹⁰⁹ In Zellkulturversuchen konnte mit der Prodomäne die Proliferation, Migration und Invasion von Krebszellen gehemmt werden.¹¹⁰ *In vivo* führte die Überexpression der Prodomäne zu einer deutlichen Reduzierung der arteriosklerotischen Gewebsveränderung in *Ldlr*^{-/-}-Mäusen. Auch die Proliferation und Migration von vaskulären Zellen der glatten Muskulatur konnte *in vitro* durch die Prodomäne gehemmt werden.¹¹¹ Es wurden auch verkürzte Derivate der Prodomäne synthetisiert, wobei die wirksamste Verbindung DYYHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSR Furin mit einer Hemmkonstante von 0,9 μ M inhibiert. Des Weiteren konnten einige Derivate, die sich von der Prodomäne der PC1/3 proPC1 ableiten, Furin in einem ähnlichem Bereich hemmen.¹¹²

Ein *high-throughput screening* (HTS) zur Identifizierung neuer PC1/3- und PC2-Inhibitoren mit einer kombinatorischen Bibliothek aus etwa 52 Millionen Hexapeptiden zeigt unterschiedliche Hemmwirkungen auf die geprüften PCs. Zum Beispiel hemmt Ac-Leu-Leu-Arg-Val-Lys-Arg-Amid PC1/3 und PC2 mit K_i -Werten von 3,2 beziehungsweise 360 nM, wobei Furin mit einem K_i -Wert von 1,4 μ M nur schwach inhibiert wird.¹¹³ Das N- und C-terminal ungeschützte Peptid H-Leu-Leu-Arg-Val-Lys-Arg-OH (**3**) ist mit einem K_i -Wert von 0,42 μ M ein stärkerer Furininhibitor und hemmt PC2 ($K_i = 3,4$ μ M) deutlich schwächer.¹¹⁴ In weiteren Studien mit einer kombinatorischen Bibliothek wurden poly-Argininderivate als potente Inhibitoren identifiziert. In Stabilitätsstudien zum furinbedingten Abbau der

wirksamsten Derivaten nona-L-Arginin ($K_i = 42 \text{ nM}$) und nona-D-Arginin-Amid (D9R; $K_i = 1,3 \text{ nM}$) erwies sich D9R als deutlich stabiler im Vergleich zum L-Derivat.^{114; 115}

Des Weiteren wurden basierend auf der Leitstruktur Ac-RARRRKKRT-Amid Derivate mit unterschiedlichen Argininmimetika in P1-Position synthetisiert. Das Derivat Ac-RARRRKK-4-Amidinobenzylamid war mit einem K_i -Wert von $1,9 \text{ nM}$ die wirksamste Verbindung dieser Serie.¹¹⁶

Abbildung 10 zeigt einige Beispiele der beschriebenen peptidischen Furininhibitoren und ihre Hemmkonstanten.

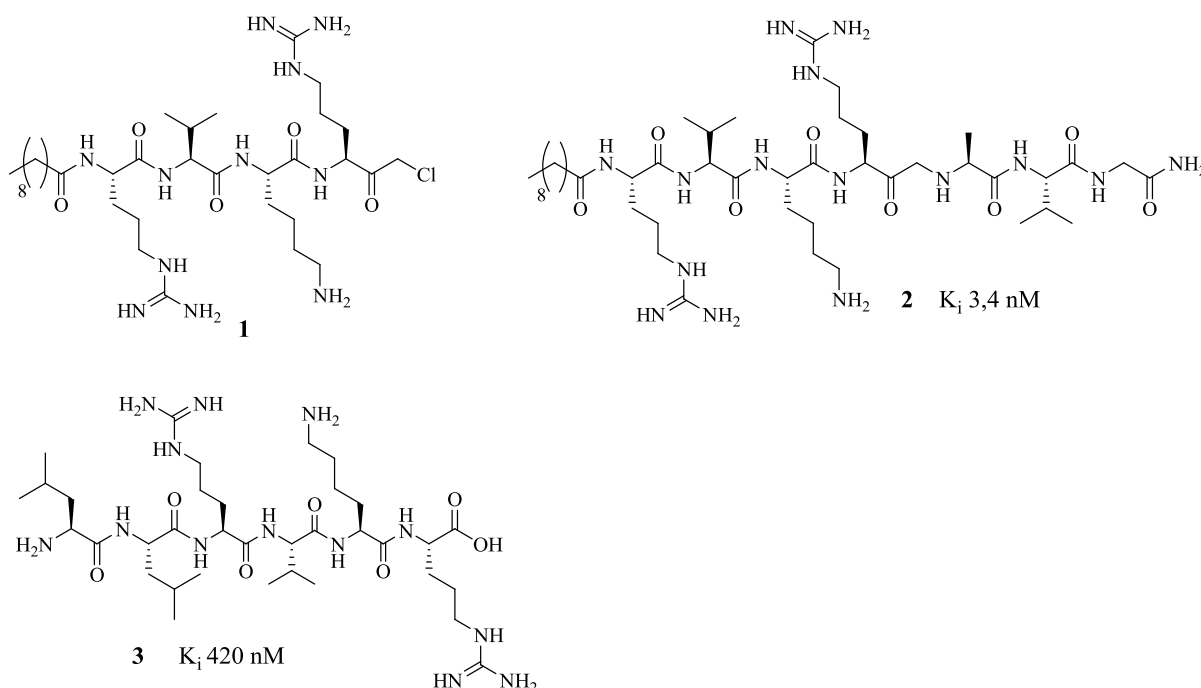


Abbildung 10: Peptidische Inhibitoren des Furins. Sofern bekannt, ist der jeweilige K_i -Wert der Verbindung für Furin unter der Verbindung angegeben.

1.2.4.3. Nicht-peptidische Inhibitoren

Niedermolekulare, nicht-peptidische Inhibitoren gelten in der Wirkstoffentwicklung aufgrund einer möglichen oralen Bioverfügbarkeit und der stärkeren Wirksamkeit auf intrazelluläre Targets als vielversprechendere Leitstrukturen im Vergleich zu makromolekularen oder reinen peptidischen Hemmstoffen. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind allerdings nur wenige wirksame Furininhibitoren dieser Klasse bekannt, von denen die meisten Derivate eine sehr schwache Hemmwirkung besitzen.

Der wirksamste Furininhibitor aus einer Serie guanylierter 2,5-Dideoxystreptamine ist Verbindung **4** mit einem K_i -Wert von 6 nM (Abbildung 11).¹¹⁷ Neben Furin inhibiert diese

Verbindung auch PC5/6 mit einer vergleichbaren Hemmkonstante von 4 nM, wobei die Affinität gegenüber PACE4 und PC7 deutlich schwächer ist. Piperazin- und Pyrrolidinderivaten wie Inhibitor **5**, die zwar eine submikromolare Affinität zu PC2 zeigen, hemmen Furin und PC1/3 allerdings nur schwach.¹¹⁸ In einer Serie schwach basischer Guanylylhydrazone konnte die tetrabasische Verbindung **6** mit einem K_i -Wert von 580 nM identifiziert werden.¹¹⁹ Dagegen ist das chloresubstituierte monobasische Amidinohydrazon-Derivat **7** mit einem K_i -Wert von 11,8 μ M nur ein moderater Furininhibitor.¹²⁰ Trotz einer schwachen Hemmkonstante von 12 μ M hemmt das zellgängige Naphthofluorescein-Derivat B3 (**8**) die furinkatalysierte Aktivierung des Zymogens der Matrixmetalloprotease MT1, wodurch es zu einer verminderten MMP2-Aktivierung und Migration der verwendeten CHO-Zellen kommt.¹²¹ Des Weiteren konnte mit dem Inhibitor B3 eine reduzierte Invasivität von humanen Fibrosarkom-Zellen (HT1080) nachgewiesen werden.

In einem HTS zur Identifizierung niedermolekularer Furininhibitoren zeigten verschiedene Dicoumarolderivate einen inhibitorischen Effekt. Verbindung **9** hemmt Furin nicht kompetitiv mit einem K_i -Wert von 1 μ M und bewirkte in Zellkulturversuchen einen Schutz vor Anthraxtoxin. Auch mit dieser Verbindung konnte die Aktivierung der Zymogenform der Matrixmetalloprotease MT1 gehemmt werden.¹²⁰

Eine Serie von Chelatkomplexen mit Kupfer- oder Zinkionen als Zentralatom und dem mehrzähligen Liganden **10** hemmen Furin im mikromolaren Bereich.¹²² Die wirksamste Verbindung, $\text{Zn}(\text{TTP})\text{Cl}_2$, hemmt Furin irreversibel mit einem IC_{50} -Wert von 9 μ M, während freies Zn^{2+} eine deutlich geringere Inhibierung zeigt. Der genaue Hemmmechanismus ist unbekannt, es wurde postuliert, dass das Histidin im aktiven Zentrum die Kupfer- oder Zinkionen bindet. Der Ligand TTP (**10**) allein zeigt keinen Hemmeffekt auf Furin.

Neben einem HTS ist auch die Testung von Verbindungen aus natürlichen Ressourcen eine Alternative, um potente Inhibitoren zu identifizieren. Beispielsweise wurde ein Screening der Inhaltsstoffe der auch medizinisch verwendeten Pflanze *Andrographis paniculata* durchgeführt.¹²³ Abgeleitet von Andrographolid wurden zahlreiche semisynthetische Verbindungen hergestellt, von denen die Verbindung SEA-4 (Monopyridinium Andrographolid 3α , $14\alpha/\beta$, 19-O-trisuccinat, **11**) mit einem K_i -Wert von 2,6 μ M die wirksamste Verbindung ist.

Abbildung 11 zeigt Beispiele für nicht-peptidische Furininhibitoren und deren publizierte K_i -Werte für Furin.

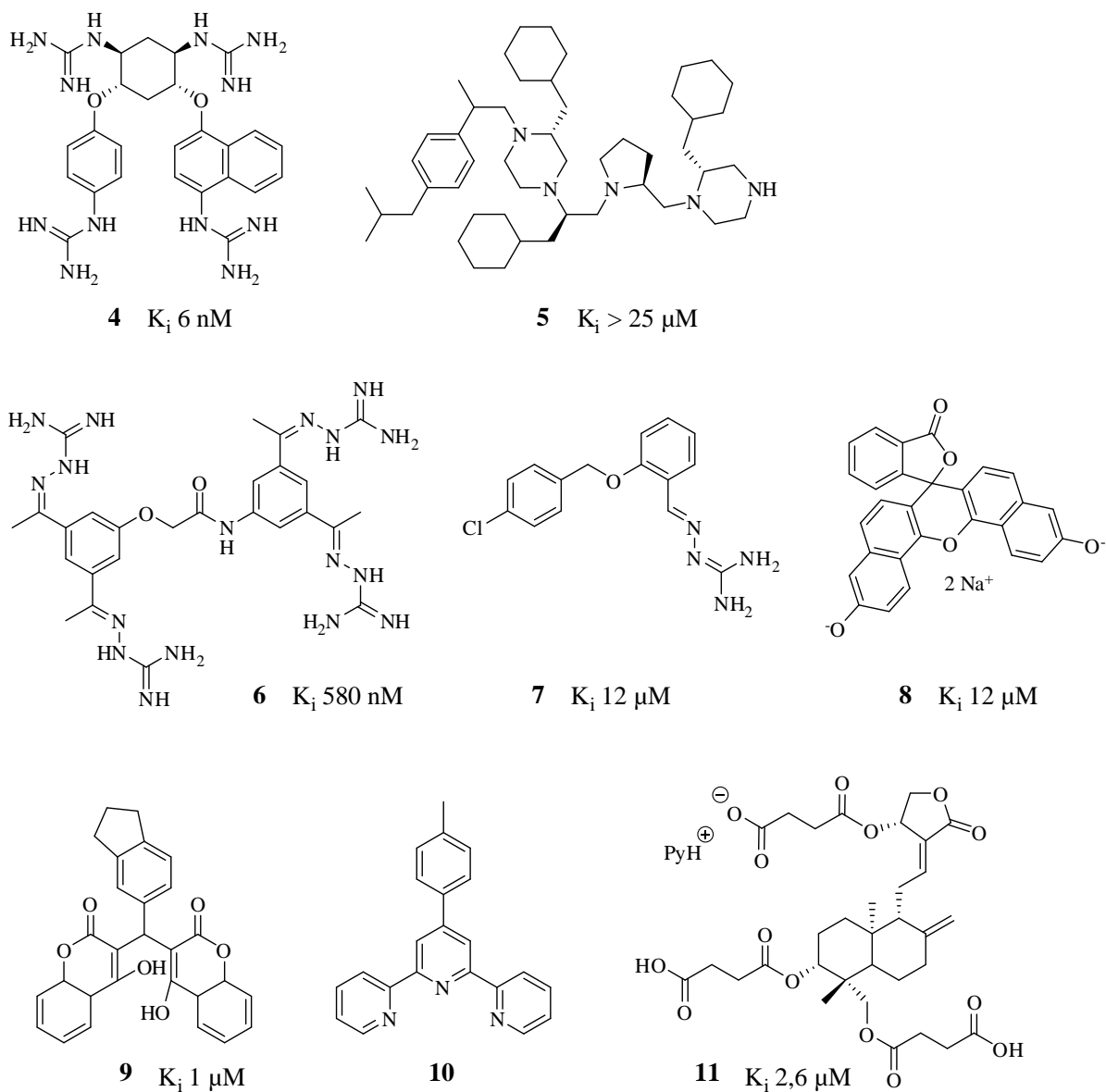


Abbildung 11: Nicht-peptidische Inhibitoren des Furins. Sofern bekannt, ist der jeweilige K_i -Wert der Verbindung für Furin unter der Verbindung angegeben.

2. Ziel der Arbeit

Neben seiner physiologischen Funktion ist die Proproteinkonvertase Furin an zahlreichen pathologischen Prozessen, wie bakteriellen oder viralen Infektionen, beteiligt. Die Entwicklung von Furininhibitoren könnte ein neuer Ansatz zur Therapie derartiger Erkrankungen sein. Basierend auf der Arbeit von Dr. Gero Becker sollten wirksame, reversibel bindende, substratanaloge Inhibitoren für Furin entwickelt, synthetisiert und enzymkinetisch charakterisiert werden.¹²⁴ Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Verbindungen sollten in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen in verschiedenen Anwendungen in Zellkultur geprüft und für Kristallisationsexperimente im Komplex mit Furin zur Verfügung gestellt werden.

Die Ziele dieser Arbeit bestanden im Einzelnen darin:

- mittels einer Kombination aus Festphasenpeptid- und Lösungssynthese wirksame Furininhibitoren zu synthetisieren, die eine hohe Stabilität aufweisen und in Zellkulturversuchen eingesetzt werden können,
- den Einfluss des P3-Rests mithilfe von unnatürlichen, hydrophoben Aminosäuren innerhalb der Leitstruktur Phac-Arg-Xxx-Arg-4-Amba zu untersuchen,
- weitere Modifikationen der Leitstruktur, durch Verlängerung oder Verkürzung der Sequenz und Einbau unterschiedlicher P5-Reste, durchzuführen,
- die Hemmwirkung der synthetisierten Verbindungen auf humanes Furin durch enzymkinetische Messungen zu bestimmen,
- ausgewählte Derivate auf die Hemmung der furinartigen Proproteinkonvertasen PC1/3 und PC2 zu untersuchen,
- die intrazelluläre Lokalisation der Furininhibitoren mithilfe eines FITC-markierten Inhibitors unter Anleitung von Dr. Frieberthäuser zu bestimmen,
- in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Garten, Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg, die Effektivität der Inhibitoren auf die Virusausbreitung

der hochpathogenen Influenzastämme H5N1 und H7N1 in Zellkultur zu bestimmen und die Zytotoxizität der Verbindungen auf die verwendeten Zellen zu untersuchen,

- in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Beyer, Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim, den protektiven Effekt ausgewählter Verbindungen gegen Anthraxtoxin in Zellkulturversuchen zu bestimmen,
- in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Sandvig, Institut für Krebsforschung des norwegischen Radium-Hospitals, die Schutzwirkung ausgewählter Verbindungen gegen Diphtherietoxin in Zellkulturversuchen zu prüfen,
- in Kooperation mit Prof. von Messling, Paul-Ehrlich Institut, die Vermehrung des Hundestaupevirus in Anwesenheit ausgewählter Verbindungen in Zellkulturversuchen zu untersuchen,
- in Kooperation mit dem Arbeitskreis von PD Dr. Than, Fritz Lipmann Institut, eine Kristallstruktur von synthetisierten Verbindungen im Komplex mit humanem Furin zu lösen und den Bindungsmodus aufzuklären, um neue Ideen für die Entwicklung verbesserter und spezifischer Inhibitoren zu erhalten.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Modifizierung des P3-Rests

Furin spaltet seine Substrate bevorzugt nach der multibasischen Konsensussequenz -R-X-R/K-R↓-X. Dieses Motiv findet sich in dem irreversiblen Inhibitor Dec-RVKR-CMK wieder und wurde auch als Ausgangspunkt für die Synthese von Inhibitoren des Typs Phac-Arg-Xxx-Arg-4-Amba genutzt, deren allgemeine Struktur ist in Abbildung 12 gezeigt.^{125; 126}

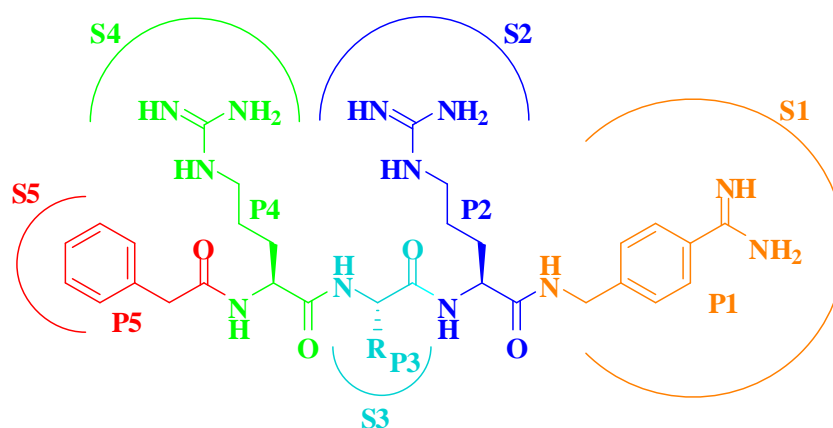


Abbildung 12: Allgemeine Struktur der synthetisierten Inhibitoren mit modifizierter P3-Aminosäure. Die Bezeichnung der Bindetaschen und Inhibitorreste erfolgte nach der Nomenklatur von Schechter und Berger.¹²⁷

In P1-Position der Leitstruktur befindet sich das decarboxylierte Argininmimetikum 4-Amdinobenzylamid (4-Amba), das auch in zahlreiche substratanaloge Inhibitoren vieler trypsinartiger Serinproteasen, wie zum Beispiel Thrombin, Urokinase, Faktor VIIa oder Faktor Xa, eingebaut wurde.¹²⁸⁻¹³¹ Der Einbau decarboxylierter P1-Reste ist eine gängige Methode peptidomimetische Inhibitoren gegen proteolytischen Abbau zu stabilisieren. Die beiden Argininreste in den Positionen P2 und P4 wurden aus der Konsensussequenz übernommen. Der aromatische Phenylacetyl-Rest in P5-Position ermöglicht die HPLC-Detektion ungeschützter P5 – P2-Intermediate während der Synthese. Des Weiteren sollten die fehlende Carbonsäureamidgruppe am C-Terminus und die fehlende N-terminale Aminogruppe die Peptidmimetika *in vivo* gegen den Abbau durch Exopeptidasen stabilisieren. Ein Sequenzvergleich von Furinsubstraten zeigt keine eindeutige Präferenz für eine bestimmte Aminosäure in Position P3.¹³²⁻¹³⁴ Wie bereits in Absatz 1.2.3 beschrieben, sieht man in der Kristallstruktur des Inhibitors Dec-RVKR-CMK in Maus-Furin, dass die Seitenkette des Valins in das Lösungsmittel gerichtet ist und bis auf einige Van-der-Waals-Wechselwirkungen keine spezifischen Bindungen mit dem Enzym eingeht. Aus diesem Grund

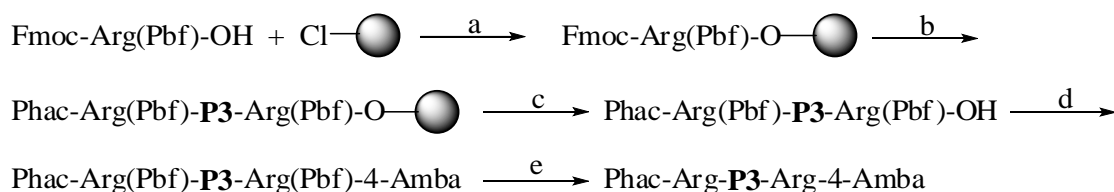
wurden in der Arbeit von Dr. Gero Becker sämtliche proteinogene Aminosäure in Position P3 der oben gezeigten Leitstruktur variiert, wobei große Unterschiede in den K_i -Werten der Verbindungen bestimmt wurden.¹²⁶ Die hydrophoben Aminosäuren Valin und Isoleucin zeigen mit Werten von 0,81 und 0,84 nM die stärkste Furinhemmung. Im Vergleich dazu, inhibiert das Leu-Derivat, das sich nur in der Anordnung einer Methylgruppe vom Isoleucin unterscheidet, Furin mit einer Hemmkonstante von 12,1 nM deutlich schwächer. Sterisch weniger anspruchsvolle P3-Reste, wie Glycin und Alanin, führen zu Verbindungen, die Furin mit K_i -Werten von 40,1 und 19,2 nM ebenfalls deutlich weniger stark hemmen als die Derivate mit verzweigten Resten. Die Verbindungen mit den sauren Aminosäuren Asp und Glu in P3 haben, wie erwartet, die schlechtesten K_i -Werte in dieser Serie. Auch konnte durch den Einbau weiterer basischer Reste keine Verbesserung der Hemmwirkung erreicht werden, obwohl ursprünglich vermutet wurde, dass die Glu257-Seitenkette des Furins möglicherweise bevorzugt an basische Reste binden sollte.

Um den Einfluss der bisher wirksamsten hydrophoben Aminosäuren in P3-Position zu untersuchen, wurden in einer neuen Serie verschiedene unnatürliche, hydrophobe Aminosäurereste eingebaut.

3.1.1. Synthese der P3-Derivate

Zu Beginn der Synthese wurde säurelabiles 2Cl-Tritylchlorid Harz mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH beladen. Dafür wurde ein Äquivalent des Aminosäurederivats zu einer Suspension des Harzes in trockenem DCM gegeben und der Ansatz 2 h bei RT geschüttelt. Im Anschluss wurde das Harz dreimal für je 1 min mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1, (v/v/v)) behandelt, um verbliebene, reaktive Stellen am Harz zu entfernen.¹³⁵ Nach diesem *capping* wurde das Harz mehrfach mit DMF und DCM gewaschen. Der weitere Aufbau des Peptidgrundgerüsts erfolgte durch automatische oder manuelle Festphasenpeptidsynthese (SPPS) nach einem Standard-Fmoc-Protokoll. Nach der Kupplung des P5-Phenyllessigsäure-Rests wurde das Rohpeptid mit 1 % TFA in DCM unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten. Um mögliche Nebenreaktionen durch die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen zu vermeiden, wurde die Abspaltzeit auf dreimal 30 Minuten festgelegt und das Lösungsmittel sofort *in vacuo* entfernt. Nach der vollständigen Harzabspaltung wurde 4-Amba \times 2 HCl an den freien C-Terminus gekuppelt. Hierfür wurde zunächst das Rohpeptid in DMF gelöst und mit drei Äquivalenten 6-Cl-HOBt suspendiert. Durch das Additiv 6-Cl-HOBt soll die bei dieser Fragmentkondensation häufig auftretende

Razemisierung der Carboxylkomponente weitestgehend reduziert werden.¹³⁶ Danach folgte die Zugabe des 4-Amba \times 2 HCl und des Kupplungsreagenzes PyBOP. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DIPEA gestartet, wobei nach kurzer Zeit aus einer bräunlichen Suspension eine klare gelbe Lösung erhalten wurde. Die Reaktionskontrolle wurde mittels HPLC durchgeführt. Bei unvollständigem Reaktionsumsatz wurde entsprechend weiteres 4-Amba \times 2 HCl zugegeben. Bei vollständigem Eduktumsatz wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und die Seitenkettenschutzgruppen durch Zugabe von 95 % TFA, 2,5 % TIS und 2,5 % H₂O (v/v/v) abgespalten. Nach 3 h wurde das Peptid in kaltem Diethylether präzipitiert, mehrfach mit Diethylether gewaschen und getrocknet. Mittels HPLC wurde kontrolliert, ob die Pbf-Schutzgruppen der Arginine vollständig abgespalten wurden. Bei unvollständiger Abspaltung der Pbf-Schutzgruppen, wurde das Peptid erneut für 3 h mit 95 % TFA versetzt und anschließend wieder in Diethylether gefällt. Die finale Reinigung aller Inhibitoren erfolgte mittels präparativer HPLC. Abschließend wurden die Verbindungen lyophilisiert und als TFA-Salze erhalten. In Schema 1 ist die Synthese der Verbindungen gezeigt.



Schema 1: Synthese der Inhibitoren mit P3-Modifikation. Reagenzien und Bedingungen: (a) Beladung von 2Cl-Tritylchlorid-Harz mit 1 eq Fmoc-Arg(Pbf)-OH und 4 eq DIPEA in trockenem DCM, 2 h; *capping* mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1, (v/v/v)), 3 \times 1 min; (b) manuelle Fmoc-SPPS, Einfachkupplungen mit 4 eq Aminosäure bzw. Phenyllessigsäure, HBTU, HOBt und 8 eq DIPEA, in DMF; (c) 1 % TFA in DCM, 3 \times 30 min; (d) 1,5 eq 4-Amba \times 2 HCl, 1,1 eq PyBOP, 3 eq 6-Cl-HOBt, 3 eq DIPEA, in DMF, 2 h; (e) TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5; v/v/v) 3 h, 35 °C. Die finalen Verbindungen wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und nach der Lyophilisation als TFA-Salze erhalten.

3.1.2. Bestimmung der Hemmkonstanten

Die Bestimmung der K_i-Werte der im Rahmen dieser Serie synthetisierten Inhibitoren erfolgte mit einem fluorogenen Assay in einem Mikrotiterplattenleser. Standardmäßig wurden auf jeder Platte auch zwei v/S-Charakteristiken zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter V_{max} und K_m gemessen. Als Substrat wurde die Verbindung Phac-RVRR-AMC (**MI-0730**) in den Konzentrationen 5, 20 und 50 μ M verwendet. Aus den Progresskurven wurde mittels linearer Regression die *steady state*-Geschwindigkeit *v* ermittelt und als Funktion der Inhibitorkonzentration für die jeweilige Substratkonzentration aufgetragen. Die Daten wurden an die Gleichung für eine kompetitive und reversible Hemmung angepasst, wodurch der K_i-

Wert bestimmt werden konnte (Formel 3, Abschnitt 5.2.1.1). Die Auswertung der gemessenen Daten ist beispielhaft für Verbindung **MI-1134** in Abbildung 13 gezeigt.

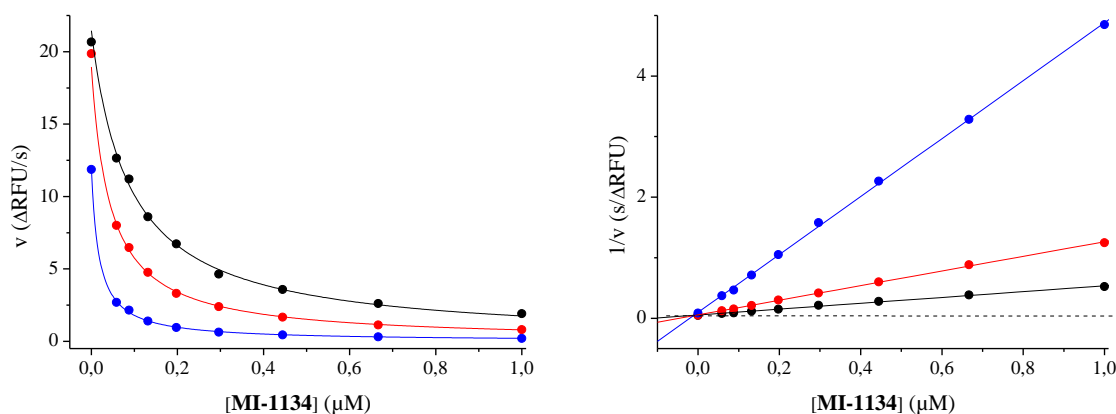


Abbildung 13: Hemmung des Furins durch Inhibitor MI-1134 (Phac-Arg-Cha-Arg-4-Amba). Für die Messungen wurde das Substrat **MI-0730** (Phac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC) in den Konzentrationen 50 (●), 20 (●) und 5 (●) μM verwendet. Links: Auftragung der Geschwindigkeit v ($\Delta\text{RFU/s}$) als Funktion der Inhibitor-Konzentration und die Anpassung an die Gleichung für eine kompetitive Hemmung (Formel 3, Abschnitt 5.2.1.1). Rechts: Dixon-Auftragung der Werte identischen Messwerte; die gestrichelte Linie entspricht $1/V_{\text{max}}$.

Neben der Bestimmung des K_i -Wertes durch Anpassung an die Gleichung für eine kompetitive Hemmung erfolgte exemplarisch eine linearisierte Auftragung nach der Methode von Dixon.¹³⁷ Hierbei wird die reziproke Geschwindigkeit $1/v$ bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen als Funktion der Inhibitor-Konzentration aufgetragen und aus dem x-Wert des Geradenschnittpunkts $-K_i$ bestimmt. Zusätzlich ist die Auftragung von $1/V_{\text{max}}$ als Parallele zur x-Achse möglich. Im Fall einer reversiblen und kompetitiven Hemmung schneiden sich die Geraden und die Parallele für $1/V_{\text{max}}$ in einem Punkt im II. Quadranten.

Die K_i -Werte der synthetisierten Inhibitoren und die jeweiligen P3-Seitenketten der Verbindung sind in Abbildung 15 (eine Gesamtübersicht aller verwendeten Inhibitoren findet sich im Anhang im Abschnitt 7.1) zusammengefasst. Die Derivate mit proteinogenen Aminosäuren in P3-Position sind in blau dargestellt und wurden von Dr. Gero Becker synthetisiert.¹²⁴

Ausgehend von dem Gly-Derivat **MI-0285**, dem jegliche P3-Seitenkette fehlt, konnte durch den Einbau eines Alanins der K_i -Wert etwa um den Faktor 2 verbessert werden. Der Austausch mit α -Aminoisobuttersäure (Aib, **MI-1139**), einem am C_α -Atom dialkylierten Derivat, bewirkte einen drastischen Abfall der Hemmwirkung mit einem K_i -Wert von 279 nM. Es ist bekannt, dass dessen Torsionswinkel ϕ und ψ in Peptiden meist in helikalen Bereichen liegen, während die P3-Aminosäuren der Furinhemmstoffe normalerweise Torsionswinkel besitzen, die typisch für β -Faltblattstrukturen sind.¹³⁸ Die Verbindung **MI-**

1117 enthält 2-Aminobuttersäure (2-Abu) in P3-Position, deren Seitenkette der eines um eine Methylengruppe verlängerten Alanins entspricht. Im Vergleich zu dem Ala-Derivat **MI-0286** konnte die Affinität nahezu um den Faktor 10 verbessert werden. In der Gegenüberstellung mit der besten Verbindung der Serie mit proteinogenen Aminosäuren in P3-Position, dem Valin-Derivat **MI-0227**, ist diese Verbindung aber weniger wirksam. Ausgehend vom bisher wirksamsten Inhibitor **MI-0227** wurden die Aminosäuren Tle (*tert*-Leucin, **MI-1116**) und Pen (Penicillamin, **MI-1182**) mit quaternärem C β -Kohlenstoffatom eingebaut, wodurch die Hemmwirkung um den Faktor 3 – 4 verbessert werden konnte. Ein möglicher Grund für die starke Affinität könnte eine Konformationsstabilisierung des Inhibitors aufgrund zusätzlicher Van-der-Waals-Wechselwirkungen innerhalb des Moleküls sein. Auch in den zugelassenen Hemmstoffen der viralen NS3-Protease des Hepatitis-C-Virus Boceprevir (Victrelis[®], MSD Sharp & Dohme) und Telaprevir (Incivo[®], Vertex Pharmaceuticals) findet sich Tle in der P3-Position. Abbildung 14 zeigt die zahlreichen inter- und intramolekularen Van-der-Waals-Wechselwirkungen des P3-Tle-Rests des Inhibitors Boceprevir in der Kristallstruktur der Virusprotease (PDB: 2OC8).^{139; 140}

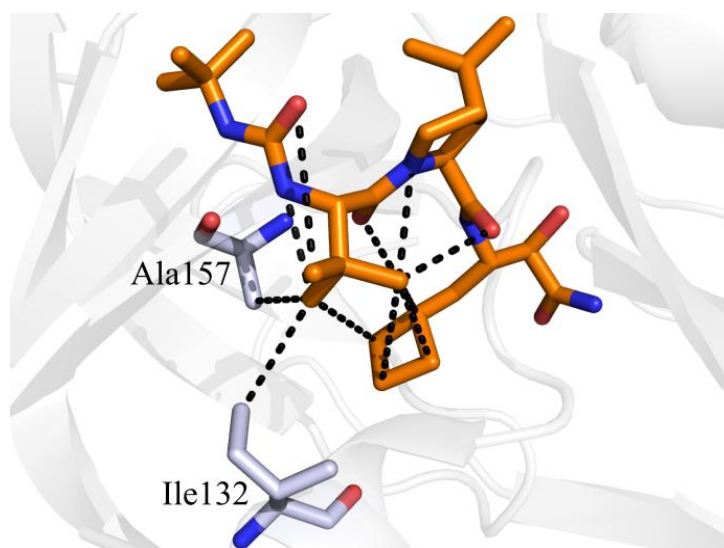


Abbildung 14: Inter- und intramolekulare Van-der-Waals-Wechselwirkungen der P3-Tle-Seitenkette von Boceprevir mit der NS3-Protease des Hepatitis-C-Virus (PDB: 2OC8). Es wurden nur die Wechselwirkungen des P3-Rests mit einer Länge von maximal 5 Å dargestellt. Die beteiligten Aminosäuren der HCV-Protease (Kohlenstoff grau, Stickstoff blau und Sauerstoff rot) sowie der Inhibitor (Kohlenstoff orange) sind im Stab-Modell dargestellt.

Tle-Reste finden sich auch in dem zugelassenen HIV-Protease Inhibitor Atazanavir, Inhibitoren von Matrixmetalloproteasen oder Peptiddeformylasehemmstoffen.¹⁴¹⁻¹⁴⁴

In der Serie mit proteinogenen P3-Aminosäuren zeigte das Leu-Derivat **MI-0291** eine deutlich geringere Affinität im Vergleich zu den Val- oder Ile-Inhibitoren. Aus diesem Grund

wurden auch die nicht-proteinogenen Aminosäuren Nva (Norvalin, **MI-1115**) und Tba (*tert*-Butyl-Alanin, **MI-1140**) in dieser Position eingebaut, die sich jeweils im Vergleich zum Leu nur in jeweils einer Methylgruppe unterscheiden. Interessanterweise führen beide Derivate zu einer stärkeren Furinhemmung mit Hemmkonstanten zwischen 2 - 4 nM. Die weitere Verlängerung der Nva-Seitenkette führte zum Nle-Derivat **MI-1137**, das jedoch einen etwas schwächeren K_i -Wert von 6,2 nM besitzt. Der Einbau zyklischer Reste erwies sich als ungeeignet, die Derivate mit Cpa (Cyclopropylalanin, **MI-1138**) und das Cha-Analogon (Cyclohexylalanin, **MI-1134**) zeigten mit K_i -Werten von 1,5 und 7,1 nM eine reduzierte Affinität im Vergleich zu den wirksamsten Inhibitoren. Der Einbau des Adamantylglycins (1-Adg, **MI-1147**) führte mit einer Hemmkonstante von 48,21 nM zu einem noch stärkeren Affinitätsverlust.

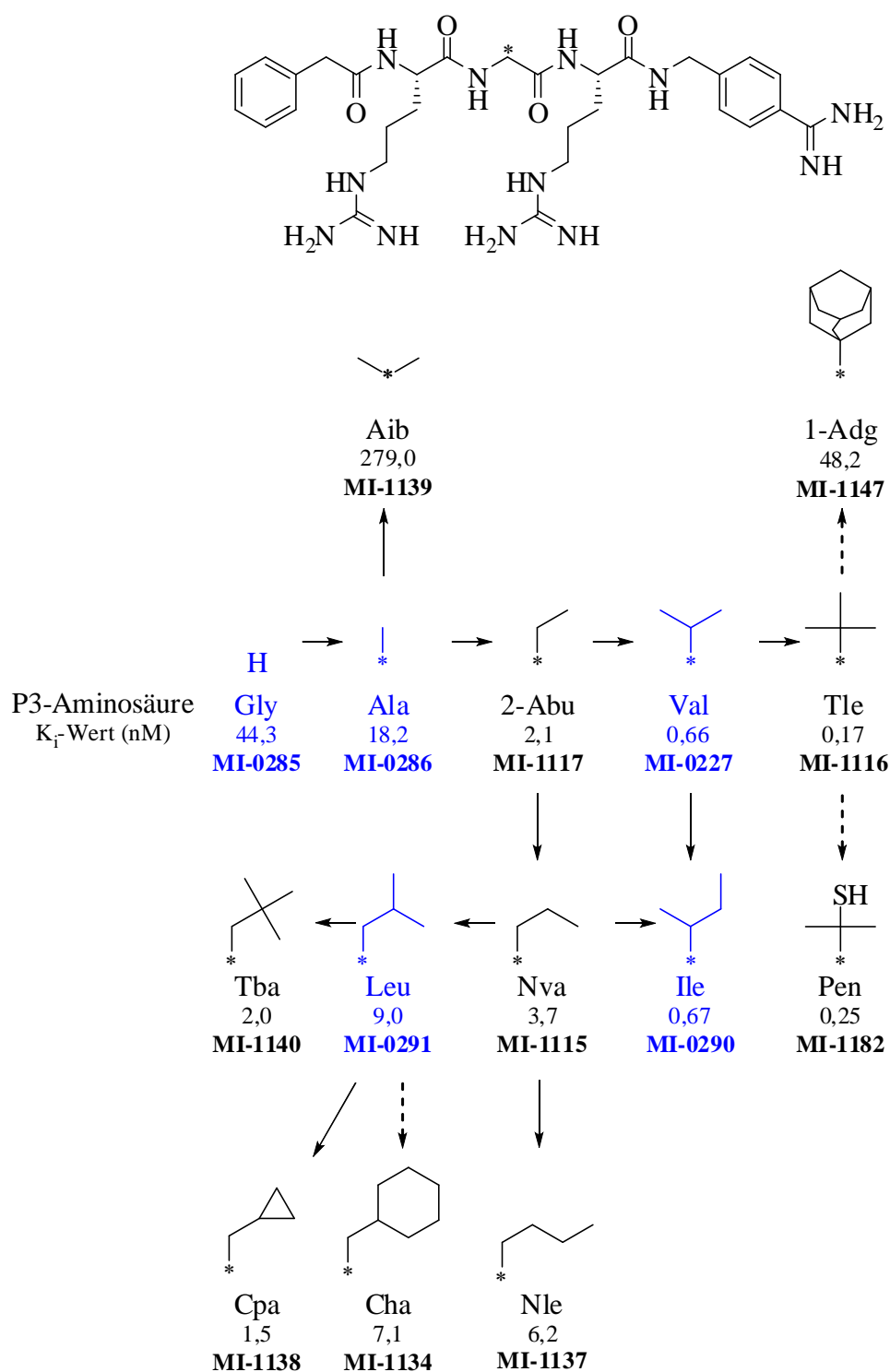
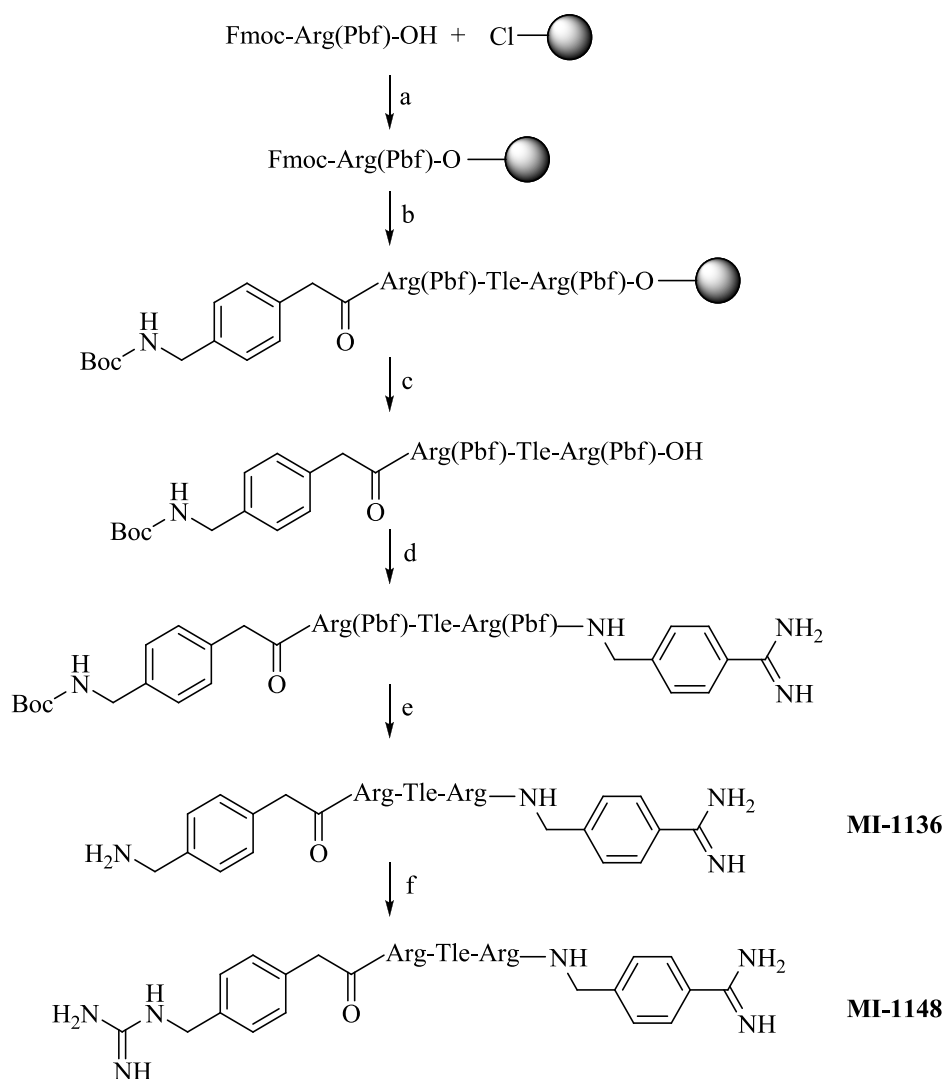


Abbildung 15: Modifizierung der P3-Position. In der Abbildung sind nur die Seitenketten der unterschiedlichen P3-Reste gezeigt, die K_i-Werte sind in der Einheit nM angegeben. Die Verbindungen mit proteinogenen Aminosäuren (blau) wurden durch Dr. Gero Becker synthetisiert.

3.1.3. Synthese der *tight-binding* Inhibitoren

Viele Furinsubstrate besitzen auch in den Positionen P5 – P8 weitere basische Aminosäurereste. Aus diesem Grund wurden bereits unterschiedliche basische Gruppen, wie die Guanidinopentanoyl- oder Guanidinomethylphenylacetyl-Gruppe, als P5-Reste in dieser Position eingebaut. Die Verbindung **MI-0701** (4-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-4-Amba) ist mit einem K_i -Wert von 16 pM ein sehr stark wirksamer Furininhibitor.¹²⁵ In der P3-Serie (Abbildung 15) wurde *tert*-Leucin als bevorzugter P3-Rest identifiziert; aus diesem Grund wurden kombinierte Hemmstoffe synthetisiert, die neben einem P3-Tle einen 3- oder 4-Guanidinomethylphenylacetyl-Rest in P5-Position besitzen.

Die Synthese verlief weitestgehend analog der Herstellung der Inhibitoren mit unsubstituiertem Phenylacetyl-Rest in Position P5. Anstelle der Phenylelessigsäure wurde in diesem Fall die Boc-geschützte 3- oder 4-Aminomethylphenylelessigsäure gekuppelt. Das Rohpeptid wurde unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen mit 1 % TFA in DCM vom Harz abgespalten und anschließend der 4-Amba-Rest an den freien C-Terminus gekuppelt. Nach vollständigem Eduktumsatz wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und die Seitenkettenschutzgruppen durch Zugabe von 95 % TFA, 2,5 % TIS und 2,5 % H₂O (v/v/v) über 3 h abgespalten. Die 3- bzw. 4-Aminomethylphenylacetyl-Vorstufen wurden in kaltem Diethylether präzipitiert und mittels präparativer HPLC gereinigt. Die lyophilisierten Benzylamin-Derivate wurden mit 1-*H*-Pyrazolcarboxamidin × HCl in 1M Na₂CO₃ in die Guanidinverbindungen überführt. Nach vollständigem Umsatz wurden die Reaktionslösungen mit TFA angesäuert (pH ≈ 3), direkt mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert. Die Synthese der Verbindungen **MI-1136** und **MI-1148** ist in Schema 2 gezeigt.



Schema 2: Synthese der Verbindungen MI-1136 und MI-1148 am 2Cl-Tritylchloridharz. Reagenzien und Bedingungen: (a) Beladung von 2Cl-Tritylchlorid-Harz mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 4 eq DIPEA, in trockenem DCM, 2 h; *capping* mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1, (v/v/v)), 3 \times 1 min; (b) manuelle Fmoc-SPPS, Einzelkupplungen mit 2 eq Boc-3- bzw. 4-Aminomethylphenyllessigsäure, HBTU, HOBT und 4 eq DIPEA, in DMF; die restlichen Aminosäurederivate wurden im 4-fachen Überschuss gekuppelt; (c) 1 % TFA in DCM, 3 \times 30 min; (d) 1,5 eq 4-Aminobenzylamin \times 2 HCl, 1,1 eq PyBOP, 3 eq 6-Cl-HOBT, 3 eq DIPEA in DMF, 2 h; (e) Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen mit TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5, v/v/v) 3 h, 35 °C, Präzipitation in kaltem Diethylether und mehrmaliges Waschen sowie Reinigung mittels präparativer HPLC; (f) 5 eq 1H-Pyrazol-1-carboxamidin \times HCl in 1 M Na₂CO₃, 24 h, RT. Die finalen Verbindungen wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und nach Lyophilisation als TFA-Salze erhalten.

3.1.4. Bestimmung der Inhibitorkonstanten der *tight-binding* Inhibitoren

In einem enzymkinetischen Vortest zeigten diese Derivate eine sehr starke Furinhemmung. Bei den Verbindungen dieser Serie handelt es sich wie bei dem Val-Analogon **MI-0701** um sogenannte *tight-binding* Inhibitoren. Dieser Typ von Hemmstoffen zeigt bei Inhibitorkonzentrationen, die im Bereich der Enzymkonzentration liegen, eine sehr starke Hemmwirkung. Eine Auswertung mittels klassischer Standardverfahren, bei denen die eingesetzte Inhibitorkonzentration mindestens zehnfach höher als die Enzymkonzentration

sein sollte, ist nicht möglich, da die während der enzymkinetischen Messung enzymgebundene Inhibitorkonzentration nicht mehr vernachlässigbar ist. Aus diesem Grund wurden die Messungen unter *tight-binding* Bedingungen durchgeführt.^{145; 146} Zur Berechnung des K_i -Wertes aus dem ermittelten scheinbaren K_i^* -Wert muss die genaue Enzymkonzentration bekannt sein, die durch Messungen mit *tight-binding* Inhibitoren bestimmbar ist.¹⁴⁶ Abbildung 16 zeigt beispielhaft die Auswertung des Inhibitors **MI-1148** zur Bestimmung des apparenten K_i^* -Wertes.

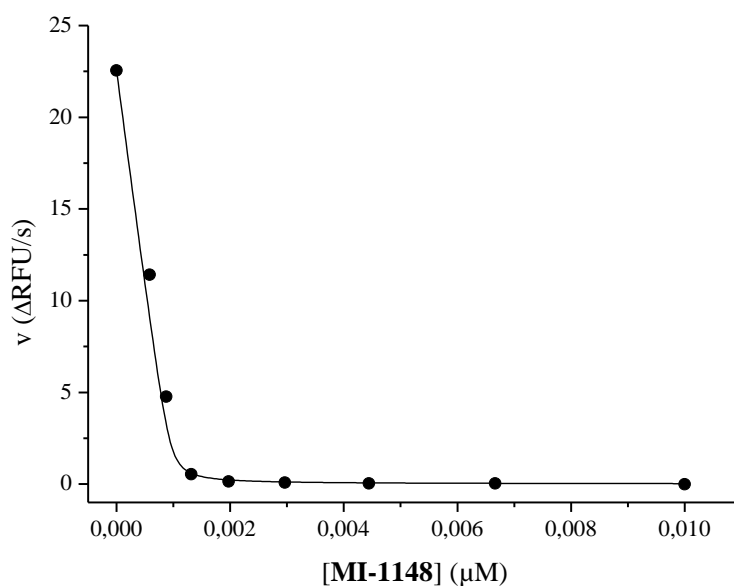
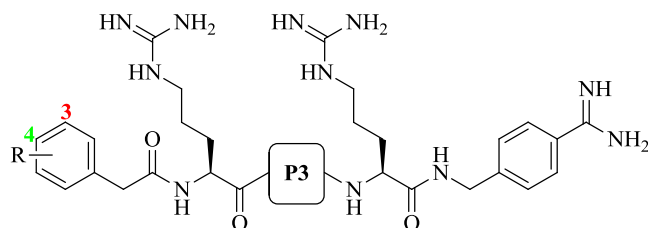


Abbildung 16: Hemmung des Furins durch Inhibitor MI-1148. Die Messungen wurden mit dem Substrat **MI-0730** bei (12,5 μM im Ansatz) und einer Furinkonzentration von 0,95 nM durchgeführt. Die Kurve wurde nach Formel 5 (Abschnitt 5.2.1.3) für *tight-binding* Inhibitoren angepasst.

Tabelle 3 zeigt die Strukturen und die bestimmten K_i -Werte der Derivate mit basischem P5-Rest und der Referenzverbindung **MI-0701**. Die Aminomethyl-Derivate **MI-1136** und **MI-1149** inhibieren Furin mit Hemmkonstanten im Bereich von 20 - 40 nM. Durch Umwandlung in die analogen Guanidinomethylverbindungen wurden noch stärkere Inhibitoren mit K_i -Werten von 5,5 und 6,7 pM erhalten.

Tabelle 3: Hemmung des humanen Furins durch Inhibitoren mit basischem P5-Rest. Die Position der Substitution des Restes R am P5-Phenylring entspricht der angegebenen Nummerierung. Die Messungen erfolgten unter *tight-binding* Bedingungen mit dem Substrat **MI-0730** (12,5 μ M im Ansatz) bei einer Furinkonzentration von 0,95 nM. (n = 3)



| MI-Nummer | R | P3 | K _i -Wert (pM) |
|-----------|---|-----|---------------------------|
| MI-0701 | | Val | 7,6 \pm 1,3 |
| MI-1136 | | Tle | 22,4 \pm 2,1 |
| MI-1149 | | Tle | 36,1 \pm 0,1 |
| MI-1148 | | Tle | 5,5 \pm 0,3 |
| MI-1150 | | Tle | 6,8 \pm 0,5 |

3.1.5. Zellkulturversuche mit Anthraxtoxin

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente wurden von Susanne Köhler in der Arbeitsgruppe von Prof. Beyer am Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim, durchgeführt.

Bei Milzbrand handelt es sich um eine weltweit auftretende Zoonose, die durch das Bakterium *Bacillus anthracis* hervorgerufen wird und sich durch hohe Mortalitätsraten auszeichnet. Das vom Bakterium sekretierte Anthraxtoxin führt zu schwerwiegenden Zellschädigungen und setzt sich aus dem sogenannten protektiven Antigen (PA), dem Ödemfaktor (EF) und dem Letalfaktor (LF) zusammen.⁷⁶ Die Intoxikation beginnt mit der Bindung des Vorläuferproteins des protektiven Antigens (PA₈₃) an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche.⁷⁸ PA₈₃ enthält eine multibasische Spaltstelle, die durch Furin oder eine verwandte PC gespalten wird. Das so aktivierte PA₈₃ bildet einen heptameren Komplex, der bis zu 3 Moleküle des LF und/oder EF binden kann und anschließend durch Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Im sauren Milieu der Endosomen

kann dieser Komplex eine Pore bilden, durch die LF und EF in das Zytosol gelangen. Dort führt LF zur Hemmung des MAP-Kinase-Signalwegs und EF zur Akkumulation von cAMP in der Zelle (Abschnitt 1.2.2.2).

Die Hemmung der furinkatalysierten Aktivierung des PA₈₃ könnte somit ein neuer Ansatz zur Behandlung von Milzbrandinfektionen sein.¹⁴⁷

Um den protektiven Effekt ausgewählter Inhibitoren gegen Anthraxtoxin zu testen, wurden murine Makrophagen-Zellen (J774 A.1) mit 500 ng/ml PA und 100 ng/ml LF in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen (0,1 – 100 µM) inkubiert. Als Referenz wurde der Inhibitor **D9R** gewählt, der in einem früher beschriebene Zelltest in murinen Makrophagen der RAW264.7-Zelllinie bei einer Konzentration von 15 µM eine Schutzwirkung von etwa 75 % zeigte.¹¹⁵

Abbildung 17 zeigt den konzentrationsabhängigen Effekt der Inhibitoren **MI-0227**, **MI-1116**, **MI-1149**, **MI-1136**, **MI-0701**, **MI-1150** und **MI-1148** sowie des Referenzhemmstoffs **D9R**.

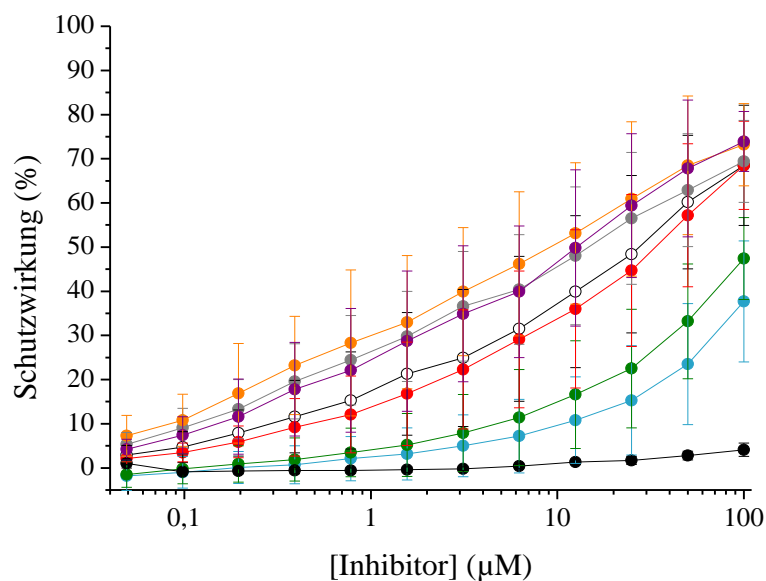


Abbildung 17: Schutzwirkung ausgewählter Inhibitoren gegen Anthraxtoxin in murinen Makrophagen. Die Zellen wurden mit 500 ng/ml PA und 100 ng/ml LF in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen der Inhibitoren **D9R** (●), **MI-0227** (●), **MI-1116** (●), **MI-1149** (●), **MI-1136** (○), **MI-0701** (●), **MI-1150** (●), und **MI-1148** (●) versetzt, wobei die Viabilität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt wurde. (n = 3)

Die stärkste Schutzwirkung wurde für die tetrabasischen Inhibitoren **MI-1148**, **MI-0701** und **MI-1150** bestimmt. Die Wirksamkeit der Benzylamin-Derivate **MI-1136** und **MI-1149** ist etwas geringer. Einen schwächeren Effekt zeigten die Derivate **MI-0227** und **MI-1116** mit unsubstituiertem Phenylacetyl-Rest in der P5-Position. Im Vergleich der Val/Tle-Paare **MI-0227/MI-1116** und **MI-0701/MI-1148** zeigten die Tle-Derivate jeweils einen etwas stärkeren

Effekt als die entsprechenden Val-Analoga. Diese Daten aus dem Zellassay korrelieren relativ gut mit den bestimmten K_i -Werten der Verbindungen gegen Furin (Abbildung 15, Tabelle 3). Der Referenzinhibitor **D9R** zeigte im Vergleich zu den anderen Verbindungen die geringste Schutzwirkung auf die Zellen. Der deutlich schwächere Effekt im Vergleich zu den oben erwähnten Daten von Kacprzak et al. ergibt sich möglicherweise durch Unterschiede bei der Versuchsdurchführung, da verschiedene Zelllinien der murinen Makrophagen sowie unterschiedliche Toxinwirkzeiten und Konzentrationen der Toxine verwendet wurden. Es ist anzumerken, dass die ausgewählten Inhibitoren keinen zytotoxischen Effekt auf die Zellen gezeigt haben (Daten nicht gezeigt).

3.1.6. Zellkulturversuche mit Diphtherietoxin

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Sandvig, am Institut für Krebsforschung des *Norwegian Radium Hospital* in Oslo durchgeführt.

Corynebacterium diphtheriae verursacht besonders bei Kindern und älteren Menschen akute Infektionen, die ernsthafte Komplikationen wie Myokarditis oder Neuropathie zur Folge haben können.⁸³ Experimente in Zellkultur zeigten, dass Furin Diphtherietoxin zwischen Arg193 und Ser194 in die Fragmente A und B spaltet.⁸⁵ Durch die Ausbildung einer Pore durch Fragment B gelangt das katalytisch wirksame Fragment A in die Zelle und führt zur Hemmung der Proteinbiosynthese durch eine ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 (Abschnitt 1.2.2.4).

Die Hemmung der furinkatalysierten Spaltung ist eine Möglichkeit, um die Wirkung des Toxins zu reduzieren. Aus diesem Grund wurde der Effekt ausgewählter Furininhibitoren auf ungespaltenes Diphtherietoxin in Vero-Zellen untersucht.

Zuerst wurde der Schutzfaktor der Inhibitoren **MI-0227**, **MI-1116**, **MI-1136**, **MI-1150**, **MI-1148** und **MI-0701** bei einer Konzentration von 100 nM auf die Wirkung des Diphtherietoxins in Vero-Zellen bestimmt (Abbildung 18). Dieser Wert gibt an, um welchen Faktor die Toxinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor höher sein muss, damit 50 % der Zellen sterben. Die Zellviabilität wurde anhand des Einbaus von ³H-Leucin bestimmt. Als Referenz wurde wiederum der Inhibitor **D9R** eingesetzt.¹¹⁵ Keine der untersuchten Verbindungen zeigte bei der verwendeten Konzentration von 100 nM einen zytotoxischen Effekt auf die Vero-Zellen.

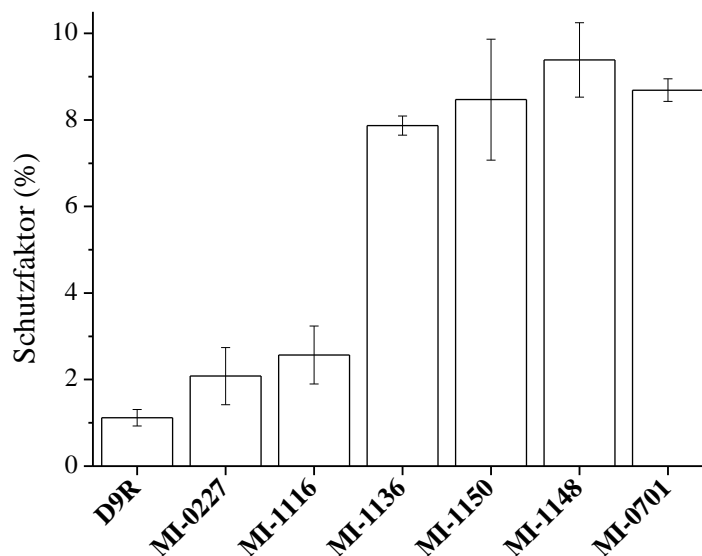


Abbildung 18: Schutzwirkung ausgewählter Inhibitoren (100 nM im Assay) gegen Diphtherietoxin in Vero-Zellen. (n = 2)

Für den Referenzinhibitor **D9R** konnte bei der gewählten Konzentration nur ein geringer Effekt bestimmt werden. Eine etwa 2-fach höhere Schutzwirkung wurde für die Inhibitoren **MI-0227** und **MI-1116** ermittelt, wobei das Tle-Derivat etwas wirksamer als die entsprechende Val-Verbindung war. Der Inhibitor **MI-1136** mit der N-terminalen para-Benzylamin-Struktur und Tle in P3-Position führte zu einer deutlich höheren Schutzwirkung von $7,87 \pm 0,22$ im Vergleich zur Kontrolle. Die stärksten Effekte wurden mit den Tle-Derivaten **MI-1148** und **MI-1150** sowie dem Val-Inhibitor **MI-0701** erzielt, die mit einer meta- oder para-Guanidinomethyl-Gruppe in P5-Position substituiert sind. Für den Inhibitor **MI-1148** wurde eine Schutzwirkung von $9,39 \pm 0,86$ und für das Val-Analogon von $8,69 \pm 0,26$ bestimmt.

Basierend auf diesem ersten Test wurde in einem zweiten Experiment die Konzentrationsabhängigkeit der besonders wirksamen Inhibitoren **MI-1148** und **MI-0701** geprüft. Die Schutzwirkung wurde bei drei Inhibitorkonzentrationen (2, 10 und 50 nM im Ansatz) untersucht, wobei die Toxinkonzentrationen von 0,1 – 100 nM variiert wurden.

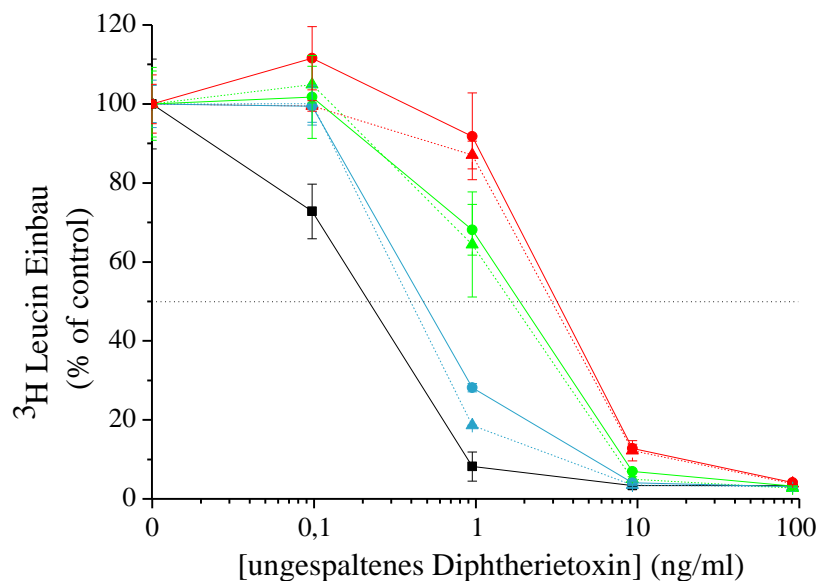


Abbildung 19: Konzentrationsabhängige Schutzwirkung der Inhibitoren MI-0701 (▲) und MI-1148 (●) gegen 0,1, 1, 10 und 100 ng/ml ungespaltenes Diphtherietoxin. Kontrolle ohne Inhibitor (■), ID₅₀ 0.23 ng/ml; **MI-0701**: 2 nM in blau, ID₅₀ 0,41 ng/ml; 10 nM in grün, ID₅₀ 1,75 ng/ml; 50 nM in rot, ID₅₀ 3,13 ng/ml; **MI-1148** 2nM in blau, ID₅₀ 0,49 ng/ml; 10 nM in grün, ID₅₀ 1,98 ng/ml und 50 nM in rot, ID₅₀ 3,38 ng/ml). (n = 2)

Beide Inhibitoren zeigten eine konzentrationsabhängige Schutzwirkung gegen Diphtherietoxin. Bei allen getesteten Konzentrationen erwies sich der Inhibitor **MI-1148** mit Tle in P3-Position als etwas wirksamer im Vergleich zu dem Val-Derivat **MI-0701**.

In einem weiteren Versuch wurde der Effekt der Inhibitoren auf bereits gespaltenes Diphtherietoxin untersucht. Keine der getesteten Verbindungen zeigte in diesem Fall einen protektiven Effekt. Dies zeigt, dass die furinkatalysierte Spaltung des Diphtherietoxins Voraussetzung für die toxische Wirkung auf die Zellen ist.

3.1.7. Zellkulturversuche mit Influenzaviren

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente zur Toxizität und Virusausbreitung wurden von Dr. Yinhui Lu in der Arbeitsgruppe von Prof. Garten, am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

HPAIV sind die Ursache für generalisierte Infektionen in Vögeln über des Endothelsystems den Respirationstrakts hinaus. Durch engen Kontakt mit infizierten Tieren oder kontaminierter Umwelt kann das Virus auch Menschen infizieren. Die Sterblichkeitsrate liegt bei 60 % aller Infektionen mit HPAIV. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch konnte bisher noch nicht festgestellt werden. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass es zur

Entwicklung leichter übertragbarer HPAIV infolge von spontanen Mutationen kommen kann, was eine große Gefahr für die Menschheit darstellt.¹⁴⁸

Der Vermehrungszyklus des Influenzavirus beginnt mit der HA-vermittelten Bindung an Rezeptoren mit endständiger Sialinsäure auf der Oberfläche der Wirtszellen. Nach endozytotischer Aufnahme der Viren und einem pH-abhängigen Konformationswechsel des HA kommt es zu einer Fusion der Virushülle mit der Zellmembran. Für eine erfolgreiche Fusion muss das Vorläuferprotein HA0 von einer Wirtszellprotease in die Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten werden.¹⁴⁹ Die Aminosäuresequenz an der Spaltstelle ist ein ausschlaggebender Faktor für die Pathogenität des Influenzavirus. HPAIV der Subtypen H5 (z.B. FPV, *fowl plague virus*, A/FPV/Rostock/34) und H7 (z.B. KAN-1-Virus, A/Thailand/1(KAN-1)/2004) besitzen eine multibasische Spaltstelle, die von Furin oder der verwandten PC5/6 gespalten werden kann. Die effektive Hemmung des Furins und furinähnlicher PCs könnte somit eine neuartige antivirale Therapie ermöglichen.⁵⁴

In vorangegangenen Experimenten wurde bereits gezeigt, dass die Verbindungen **MI-0227** und **MI-0701** die HA0-Spaltung und die Virusausbreitung des FPV (H7N1) in MDCK II-Zellen hemmen.^{125; 135} Aus diesem Grund wurden einige neu synthetisierte Verbindungen auf die Hemmung der Ausbreitung hochpathogener Influenzaviren in Zellkultur untersucht.

In Vorversuchen wurde der Einfluss der Inhibitoren **MI-0227**, **MI-0701**, **MI-1116**, **MI-1136**, **MI-1148**, **MI-1149** und **MI-1150** in Konzentrationen von 25 und 50 μM auf die Viabilität von MDCK II-Zellen mittels MTT-Tests bestimmt (Abbildung 20).¹⁵⁰ Die Inhibitoren zeigten bei den gewählten Konzentrationen einen marginalen zytotoxischen Effekt. Im Vergleich zur Kontrolle ist die Lebensfähigkeit der Zellen um maximal 15 % reduziert.

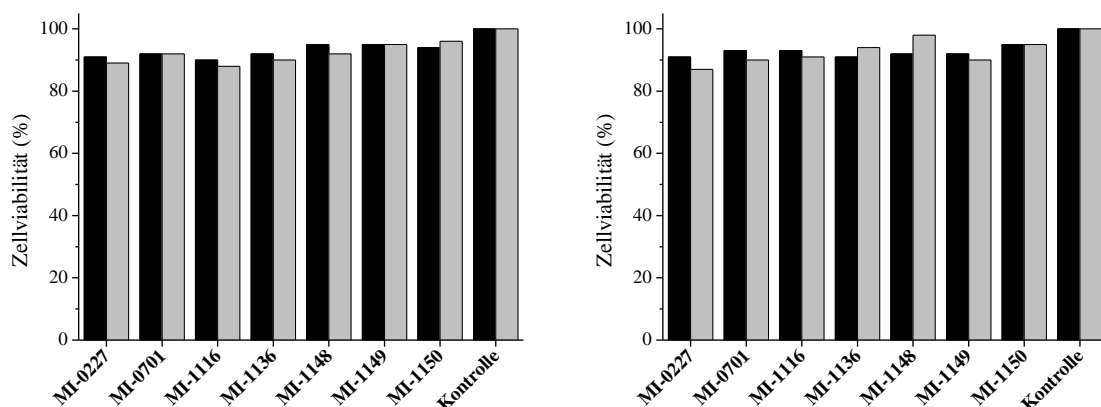


Abbildung 20: Bestimmung der Zytotoxizität ausgewählter Inhibitoren auf MDCK II-Zellen mit dem MTT-Test nach Inkubation über 24 h (schwarz) und 48 h (hellgrau). In der linken Abbildung betrug die Inhibitorkonzentration im Assay 25 μM und in der rechten 50 μM . Als Kontrolle wurden Zellen ohne Inhibitorzugabe identisch behandelt und das Ergebnis auf 100% skaliert.

Aufgrund der verhältnismäßig geringen Toxizität konnten weitere Experimente zur Hemmung der Virusausbreitung in Zellkultur durchgeführt werden.

In einem zweiten Versuch wurde die Wirkung der neusynthetisierten Verbindungen auf die Virusausbreitung des FPV (H7N1) untersucht. Als Referenz wurde die Verbindung **MI-0701** verwendet. Bodenhaftende MDCK II-Zellen wurden mit Medium überschichtet und bei einer MOI von 0,001 mit FPV infiziert. Die niedrige MOI ermöglicht eine relativ langsame multizyklische Replikation des Virus, die der frühen Infektion entspricht, wenn der Wirt nur wenigen Viren ausgesetzt ist. Eine Stunde nach der Infektion wurden die Zellen gewaschen und mit den jeweiligen Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Fixierung und Permeabilisierung wurden die infizierten Zellen immunhistochemisch durch eine konjugierte Immunfärbung markiert. Die infizierten Zellen erscheinen als „raketenförmige“ blaue Punkte auf dem Zellrasen, was durch Immunfärbung der viralen Nukleoproteine sichtbar gemacht werden konnte. Wurde die Ausbreitung des Virus durch die Inhibitoren gehemmt, waren weniger blaue Punkte zu sehen, wobei eine Färbung aller Zellen einer globalen Infektion entspricht. Abbildung 21 A zeigt die Hemmung der Ausbreitung der FPV in Anwesenheit unterschiedlicher Furininhibitoren. Im Vergleich zur Kontrolle wiesen die Verbindungen **D9R** und **MI-1116** in dem gewählten Konzentrationsbereich von 0,5 – 50 µM keinen Effekt auf. Eine sichtbare Hemmung der Virusausbreitung wurde für den Inhibitor **MI-1136** beobachtet, der einen para-Aminomethylphenylacetyl-Rest in Position P5 und Tle in Position P3 besitzt. Erstaunlicherweise zeigte das analoge meta-Derivat **MI-1149** einen deutlich geringeren Effekt auf die Virusausbreitung. Die stärkste Hemmung konnte mit den Derivaten **MI-1150** und **MI-1148** sowie der Referenzverbindung **MI-0701** erreicht werden, wobei besonders die Inhibitoren **MI-1148** und **MI-0701** zu einer deutlichen Reduzierung der Virusausbreitung bis zu Konzentrationen von 5 µM führten.

Parallel dazu wurde auch die Hemmwirkung der Inhibitoren auf die Vermehrung des KAN-1 Virus (H5N1) untersucht. Dieses Virus ist ein H5-Subtyp und zählt wie FPV zu den hochpathogenen aviären Influenzaviren. Abbildung 21 B zeigt die Ausbreitung des KAN-1 Virus in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen. Wie im Fall des FPV zeigten die Inhibitoren **D9R** und **MI-1116** keinen Effekt auf die Virusausbreitung. Eine leichte Hemmung konnte für den Inhibitor **MI-1149** nachgewiesen werden. Die stärkste Hemmwirkung auf die Vermehrung des KAN-1 Virus konnte mit den neu entwickelten Inhibitoren **MI-1136**, **MI-1150**, **MI-1148** sowie der bekannten Referenzverbindung **MI-0701** beobachtet werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem Inhibitor **MI-0701** zeigten die

Tle-Derivate jedoch keine stärkere Hemmwirkung auf die Ausbreitung des FPV und des KAN-1 Virus.

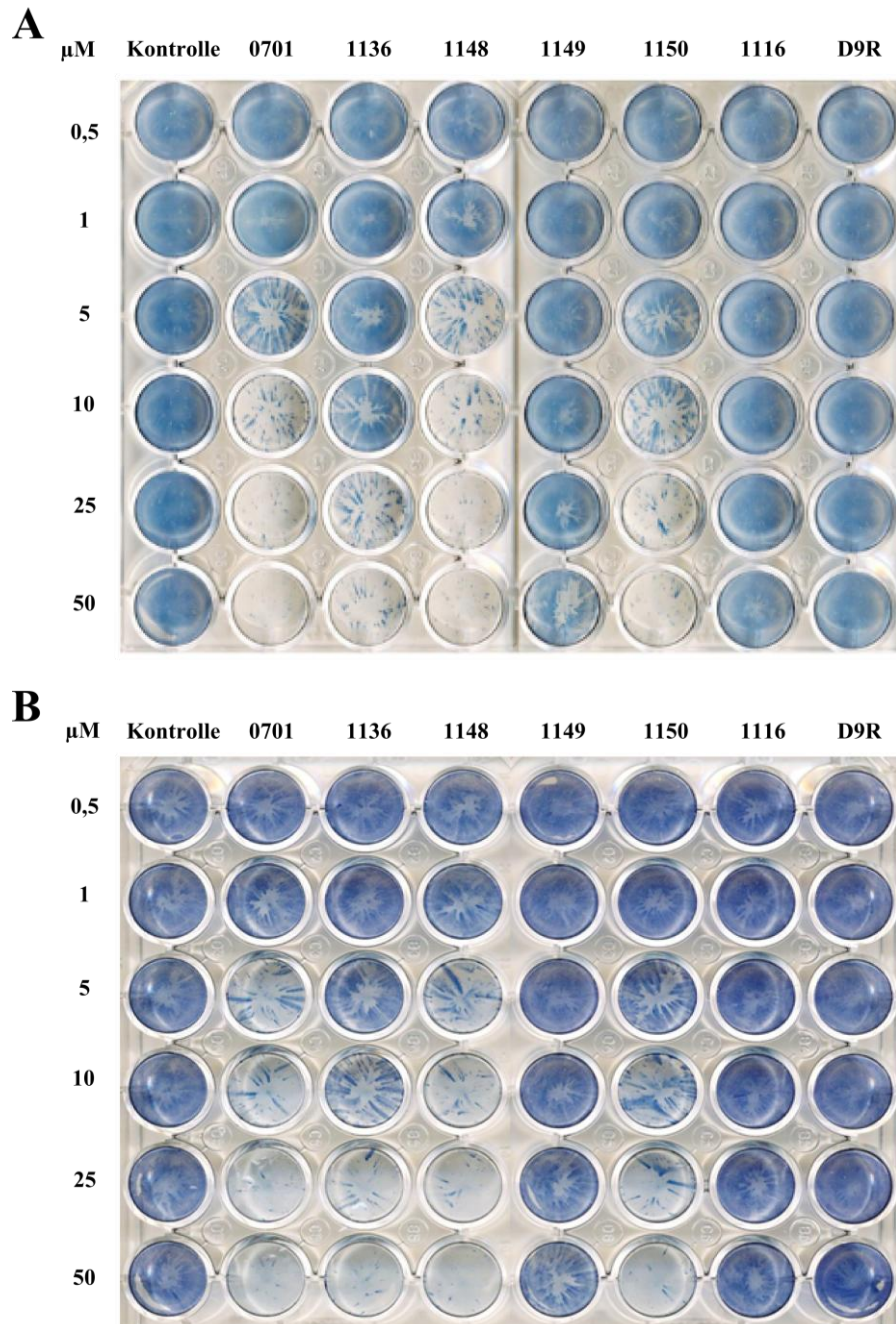


Abbildung 21: Hemmung der Virusausbreitung in MDCK II-Zellen durch ausgewählte Inhibitoren. MDCK II-Zellen wurden mit FPV (A) oder KAN-1 Virus (B) bei einer MOI von 0,001 infiziert. Eine Stunde später wurden die Zellen gewaschen und mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen (50 – 0,5 μM) versetzt. Nach der Inkubation über 24 h bei 37 °C wurden die infizierten Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die infizierten Zellen wurden mit Hase-anti-FPV-Antikörpern und HRP-gekoppeltem Esel-anti-Hase-Antikörpern sowie der anschließenden Umsetzung des True Blue Peroxidase Substrats (KPL, Gaithersburg, MD, Vereinigte Staaten) angefärbt.

3.1.8. Zellkulturversuche mit dem Hundestaupevirus

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente zur Virusausbreitung wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. von Messling am Paul-Ehrlich-Institut in Langen durchgeführt.

Das eng mit dem Masernvirus verwandte Hundestaupevirus (*canine distemper virus*, CDV) kann zu schweren Infekten bei Karnivoren, wie Hunden, Mardern oder Hyänen, führen. Eine Erkrankung kann ernsthafte Komplikationen wie eine Leukoenzephalomyelitis und die damit einhergehende Demyelinisation der Nervenzellen zur Folge haben.^{68; 71} Furin spaltet das Vorläuferprotein des Fusionspeptids F₀ des CDV im TGN in die Untereinheiten F₁ und F₂. Dadurch wird die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle möglich. Die Hemmung des Furin oder furinähnlicher PCs könnte somit ein Ansatz in der Entwicklung von Arzneistoffen zur Behandlung der Hundestaupe und verwandter Viren dieser Familie sein.

Aus diesem Grund wurde der Effekt der Furininhibitoren **MI-1116**, **MI-0701** und **MI-1148** sowie der Referenzverbindung **D9R** auf die Vermehrung von CDV in VeroSLAMdogtag-Zellen untersucht. Zur Quantifikation der infektiösen Viren wurden die viralen Titer im Überstand und in den zellulären Fraktionen an den Tagen 1, 2 und 3 nach der Infektion gemessen. Die Bestimmung der Virustiter (TCID₅₀, *tissue culture infection dose 50*) erfolgte nach der Methode von Spearman und Kärber über die Berechnung des dekadischen Logarithmus, bei der 50 % der Ansätze einen zytopathischen Effekt zeigten.¹⁵¹ Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse für die jeweiligen Inhibitoren bei Konzentrationen von 50, 5, 0,5 und 0,05 µM. Im Fall der weniger wirksamen Inhibitoren **D9R** und **MI-1116** ist eine signifikante Reduktion der Virustiter im Überstand und den zellulären Fraktionen nur bei einer Konzentration von 50 µM zu sehen. Die potenteren Derivate **MI-0701** und **MI-1148** führen bei niedrigeren Konzentrationen zu einer deutlich stärkeren Abnahme der Virustiter in beiden Fraktionen. Im Fall des Inhibitors **MI-1148** kommt es noch bis zu einer Konzentration von 0,5 µM zu einer deutlichen Verringerung der Viruslast.

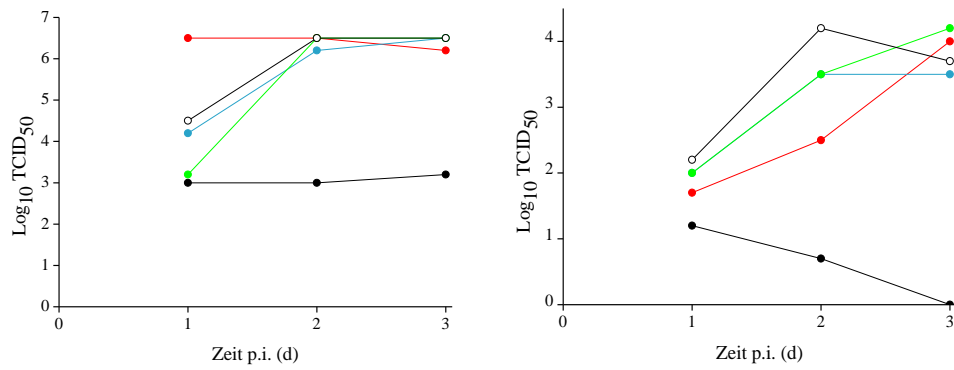
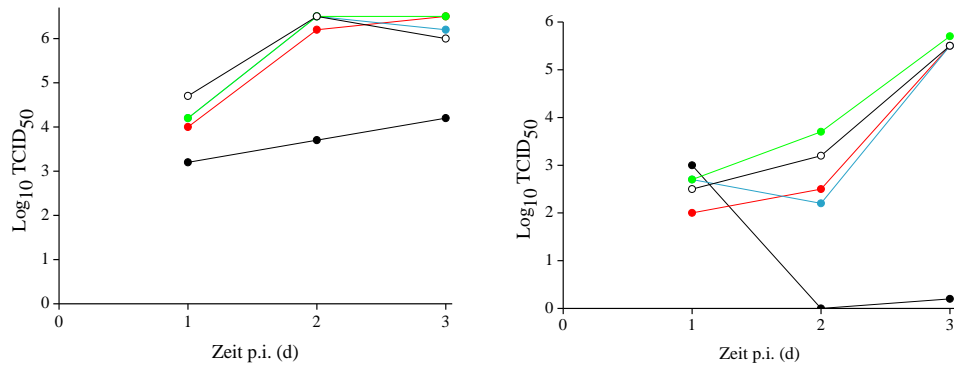
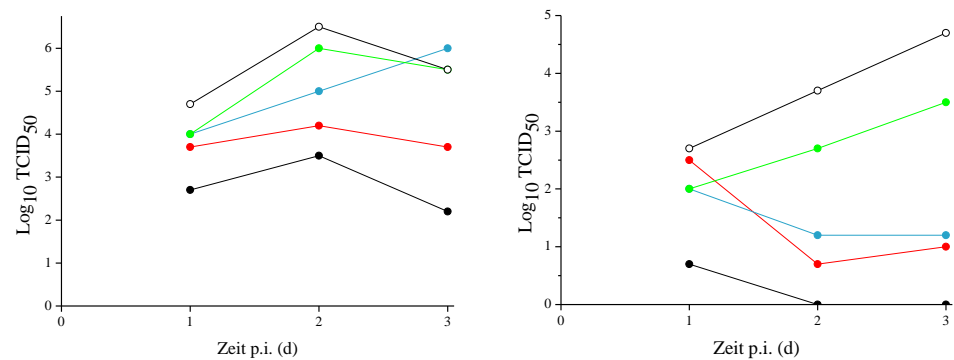
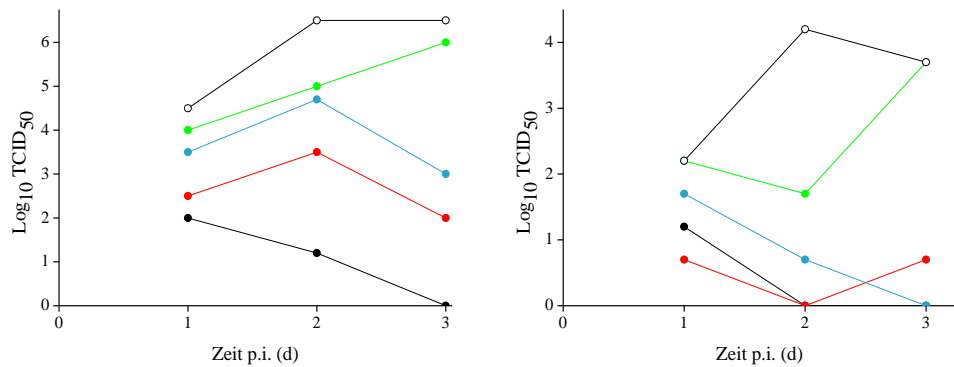
D9R**MI-1116****MI-0701****MI-1148**

Abbildung 22: Infektion von VeroS_{LAM}dogtag-Zellen mit CDV in Gegenwart der Furinhemmstoffe D9R, MI-1116, MI-0701 und MI-1148 (50 (●), 5 (●), 0,5 (●), 0,05 (●) und 0 (○) μM). Nach 24, 48 und 72 h p.i. wurden die viralen Titer (TCID_{50}) der zellulären Fraktionen (links) und im Überstand (rechts) bestimmt. (n = 2).

3.1.9. Selektivitätsbestimmung mit PC1/3 und PC2

Wie bereits im Kapitel 1.1 erwähnt, sind die Substratspezifitäten der kexinartigen PCs relativ ähnlich, so dass eine redundante Prozessierung einiger Substrate durch verschiedene Proteasen möglich sein sollte. Ein Vergleich der Kristallstruktur des Furins mit Homologiemodellen der anderen PCs zeigt, dass besonders die S6 – S1 Region hochkonserviert ist. Unterschiede finden sich vor allem in den *primed regions* östlich der S1-Tasche und teilweise in einigen *loops* auf der Enzymoberfläche.¹⁰

Im Weiteren soll vor allem auf die Unterschiede zwischen Furin und PC1/3 sowie PC2 eingegangen werden, da im Rahmen dieser Arbeit enzymkinetische Messungen mit diesen Enzymen durchgeführt wurden.

Im Vergleich zur katalytischen Domäne des Furins besitzt PC1/3 eine Sequenzhomologie von 61,4 % und PC2 von 55,5 %, wobei all diese PCs ungewöhnlich viele saure Aminosäurereste im aktiven Zentrum besitzen (Tabelle 4).¹⁰

Tabelle 4: Charakteristische Aminosäurereste im S1 - S5 Segment. Die Nummern der Aminosäuren entsprechen der Furinsequenz. Negativ geladene Reste sind in rot, polare in orange und hydrophobe in grün dargestellt.¹⁰

| | S5 | | S4 | | S3 | S2 | | | S1 | |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 257 | 259 | 236 | 264 | 257 | 154 | 192 | 191 | 306 | 258 |
| Furin | E | D | E | D | E | D | N | D | D | D |
| PC1/3 | N | D | E | E | N | D | N | E | D | D |
| PC2 | T | N | E | D | T | D | N | F | D | D |

Enzymkinetische Messungen ähnlicher Inhibitoren dieses Typs mit verwandten PCs zeigten, dass vor allem auch PACE4, PC4, PC5/6 und PC1/3 sehr stark gehemmt wurden, jedoch die Affinität zu PC2 und PC7 deutlich geringer war.^{125; 135} Aus diesem Grund wurde erwartet, dass auch die Derivate der P3-Serie sowie die Tle-Derivate mit basischem P5-Rest PC1/3 stark hemmen, jedoch schwächere PC2-Inhibitoren sind.

Aufgrund der begrenzten verfügbaren Enzymmengen wurden nur die Restaktivitäten der PC1/3 und PC2 in Gegenwart einer konstanten Inhibitorkonzentration bestimmt. Für beide Enzyme wurden nicht-lineare Progresskurven bei den enzymkinetischen Messungen erhalten. Im Fall der PC1/3 resultiert dies möglicherweise aus einer Substrataktivierung oder der relativ langsamen Dissoziation gebildeter Enzymoligomere (persönliche Mitteilung von Prof. Lindberg). Aus diesem Grund wurde die Geschwindigkeit durch lineare Anpassung der Messdaten im relativ linearen Bereich von 1000 – 1800 Sekunden im Fall der PC1/3 und von 0 – 600 Sekunden im Fall der PC2 bestimmt. Abbildung 23 zeigt beispielsweise die

Progresskurven für Messungen mit PC1/3 (links) und PC2 (rechts) in Gegenwart von ausgewählten Inhibitoren im Vergleich zur Kontrolle.

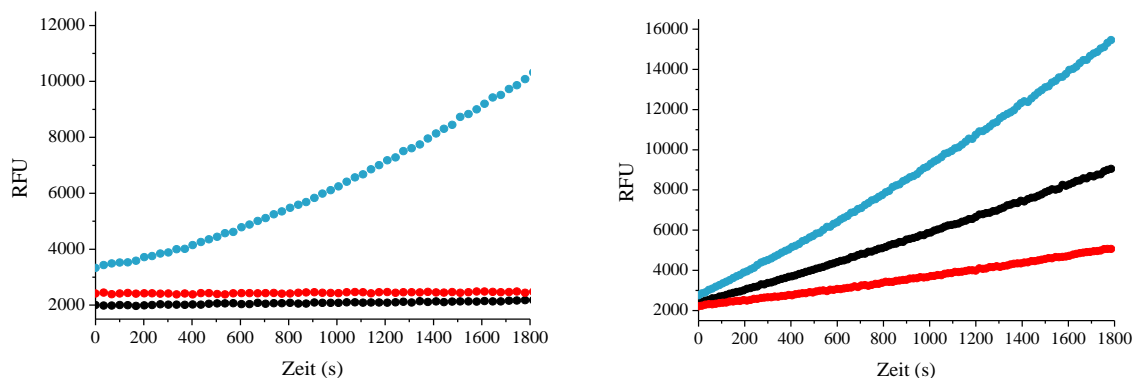


Abbildung 23: Progresskurven in Gegenwart einer Konzentration von 1 μM der Inhibitoren MI-0227 (●), MI-1148 (●) und in Abwesenheit eines Inhibitors (●) mit PC1/3 (links) und PC2 (rechts) in Anwesenheit des Substrates pGlu-RTKR-AMC (200 μM im Ansatz).

Die ermittelte Steigung in Abwesenheit eines Inhibitors wurde als 100 % festgelegt. Das linke Balkendiagramm in Abbildung 24 zeigt die Restaktivität der PC1/3 in Gegenwart der jeweiligen Inhibitoren in einer Konzentration von 1 μM . Analog zu den bestimmten K_i -Werten für Furin hemmen die P3-Derivate mit Val, Ile, Tle und Pen als auch besonders die Tle-Derivate mit basischem P5-Rest PC1/3 sehr stark. Die bestimmte Restaktivität lag für einige Derivate unter 10 %, wodurch Aktivitätsunterschiede nur schwer detektierbar sind. Aus diesem Grund wurde eine weitere Messung bei einer reduzierten Inhibitorkonzentration von 0,1 μM durchgeführt (Abbildung 24). Die stärkste Hemmung der PC1/3 wurde, wie im Fall des Furins, mit dem 4-Guanidinomethyl-substituiertem Inhibitor **MI-1148** erzielt, gefolgt von dem Benzylamin-Analogon **MI-1136** (Abbildung 15 und Tabelle 3).

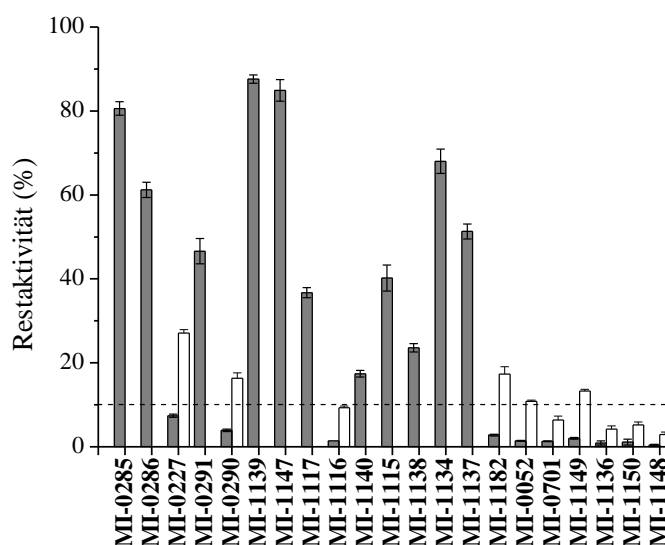


Abbildung 24: Bestimmte Restaktivität der PC1/3-katalysierten Spaltung des Substrates pGlu-RTKR-AMC (200 µM im Messansatz) in Gegenwart von Inhibitorkonzentrationen von 1 µM (grau). Nur die Inhibitoren mit einer Restaktivität ≤ 10 % wurden nochmals bei einer Konzentration von 0,1 µM (weiß) vermessen.

Wie im Fall der PC1/3 wurde auch für PC2 die Restaktivität bei einer Inhibitorkonzentration von 1 µM bestimmt. Die Hemmwirkung fiel, wie erwartet, deutlich schwächer als im Fall des Furins oder der PC1/3 aus. Der Unterschied zwischen den Derivaten der P3-Serie mit neutraler P5-Phenylacetyl-Gruppe und den Val- und Tle-Inhibitoren mit basischem P5-Rest ist weniger stark ausgeprägt (Abbildung 25).

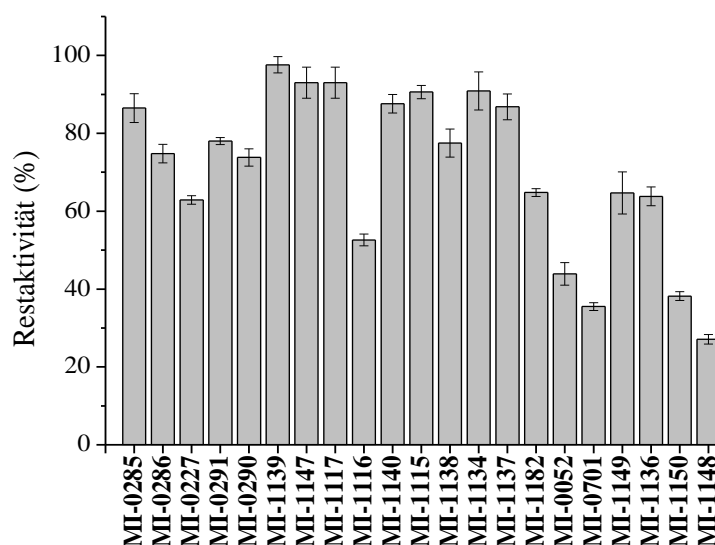


Abbildung 25: Bestimmte Restaktivität der PC2-katalysierten Spaltung des Substrates pGlu-RTKR-AMC (200 µM im Messansatz) in Gegenwart von Inhibitorkonzentrationen von 1 µM.

Obwohl die S5 – S1-Bindetaschen der furinartigen PCs relativ ähnlich sind, gibt es geringe Unterschiede, wodurch die unterschiedliche Hemmung der Proteasen erklärbar sein könnte.¹⁰ Alle PCs haben ein ausgeprägt negativ geladenes aktives Zentrum. Furin besitzt die meisten sauren Reste in dieser Region, während PC1/3 und besonders PC2 hier deutlich weniger saure Aminosäuren haben. Unterschiede treten zum Beispiel im Bereich der S2-Tasche auf, wo das nicht an der Substratbindung beteiligte Asp191 des Furins bei PC1/3 gegen ein Glu und bei PC2 durch ein Phe ausgetauscht ist. Im Fall der PC2 sorgt dieser Austausch für eine Abschirmung des P2-Rests vom Lösungsmittel. Einen möglichen Effekt auf die Bindung hat auch die unterschiedlich ausgeprägte S4-Tasche. Bei PC2 findet sich eine Insertion in der Gln229 - Met231-Schleife oberhalb der S4-Tasche, die dafür sorgt, dass dieser *loop* im Vergleich zu Furin weiter ins Lösungsmittel ragt.¹⁰ Zusätzlich ist Val231 in Furin gegen Met in PC2 ausgetauscht, wodurch die Tasche möglicherweise etwas enger wird und somit ein Argininrest in der P4-Position weniger gut in diese Tasche passt. Die Präferenz der PC2 für basische P4-Reste ist geringer ausgeprägt als im Fall des Furins. Weitere Unterschiede finden sich in der S5-Tasche, wo das konservierte Asp259 im Fall der PC2 gegen ein Asn ausgetauscht ist. Des Weiteren ist das Glu257 des Furins bei der PC1/3 gegen ein Asn und bei PC2 gegen Thr ausgetauscht. Basierend auf dem modellierten Bindungsmodus des Octapeptids $\text{NH}_2\text{-(Arg)}_3\text{-Val-Lys-Arg-Ser-Leu-OH}$ könnten diese Unterschiede erklären, warum bei beiden Enzymen die Affinität für basische Reste in Position P5 geringer als im Fall des Furin ist.¹⁰

Die untersuchten Inhibitoren besitzen eine starke Hemmwirkung gegen PC1/3, es ist daher anzunehmen, dass analog zu früheren Arbeiten mit strukturell ähnlichen Inhibitoren auch die PCs PACE4, PC4 und PC5/6 durch die Verbindungen stark gehemmt werden.^{125; 135}

Im Allgemeinen ist eine geringe Selektivität von Inhibitoren ein Nachteil bei der Wirkstoffentwicklung, da möglicherweise mehrere normale physiologische Prozesse gleichzeitig gehemmt werden und somit zahlreiche Nebenwirkungen auftreten könnten. Aufgrund von Redundanz bei der Prozessierung bestimmter Substrate im Fall der PCs, ist aber möglicherweise eine geringere Selektivität der Verbindungen bei kurzzeitigen Anwendungen, speziell der Behandlung von Infektionskrankheiten, sogar sinnvoll. Denkbar wäre, dass die Hemmung des Furins alleine nicht ausreicht, um die Prozessierung bestimmter Substrate zu verhindern, weil sie durch verwandte PCs ebenfalls gespalten werden könnten.

3.2. Kristallstruktur des humanen Furins im Komplex mit Inhibitor MI-1148

In der Arbeitsgruppe von Dr. Manuel Than konnte eine Kristallstruktur des humanen Furins im Komplex mit dem Inhibitor **MI-1148** und einer Auflösung von 2,1 Å gelöst werden. Für die Kristallisation wurde zunächst eine verkürzte Form des humanen Furins (Asp23 - Ala574) und der substratanaloge, reversible Inhibitor **MI-0052** (3-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-4-Amba) verwendet. Anschließend wurde durch sogenanntes *soaking* der Inhibitor **MI-0052** durch die Verbindung **MI-1148** ausgetauscht.

Der Inhibitor **MI-1148** besitzt mit dem Tle in der P3-Position einen hydrophoben Zentralbaustein, der N- und C-terminal von zwei basischen Resten flankiert wird, was strukturell einem symmetrischen Aufbau ähnelt. Für strukturell ähnliche Inhibitoren wurde postuliert, dass ein reverser Bindungsmodus möglich sein könnte.¹⁵² Hierbei würde der Guanidinomethylphenylacetyl-Rest in die S1-Tasche und der 4-Amba-Rest in die S5-Tasche binden. Nach SAR (*structure-activity relationship*)-Studien ist dieser Bindungsmodus aber eher unwahrscheinlich. Die Kristallstruktur mit der Verbindung **MI-1148** ermöglicht somit die Bestimmung des Bindungsmodus dieses Inhibitorotyps.

In der S1 – S8-Region des Furins befinden sich 13 saure Aminosäurereste, wodurch die hohe Spezifität für stark basische Inhibitoren erklärbar ist. Abbildung 26 zeigt die Kristallstruktur des Inhibitors **MI-1148** im aktiven Zentrum des humanen Furins.

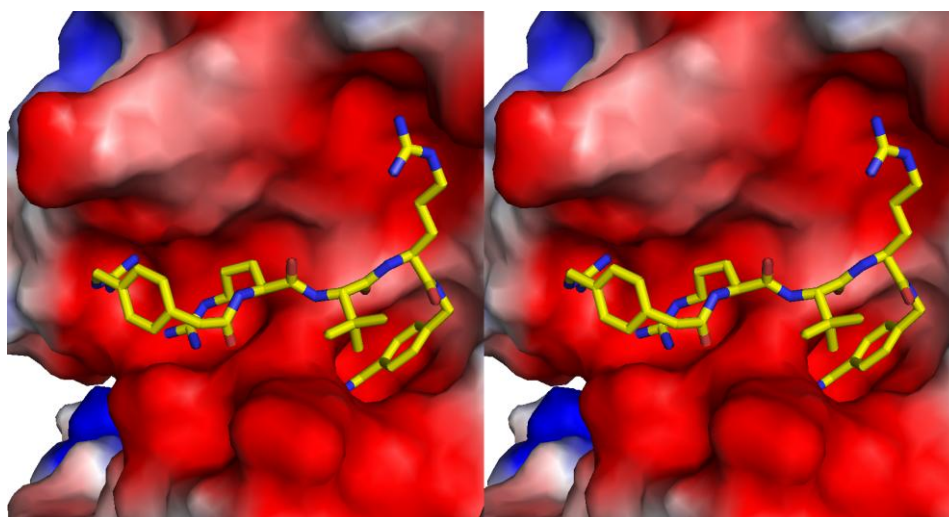


Abbildung 26: Stereobild des Furins im Komplex mit Inhibitor MI-1148. Der Inhibitor ist mit gelben Kohlenstoffatomen (Stickstoff blau und Sauerstoff rot) vor dem aktiven Zentrum des Furins dargestellt. Die Furinoberfläche wurde entsprechend ihrer berechneten negativen (- 60,574 kT/e, rot) und positiven (+ 60,574 kT/e, blau) elektrostatischen Potentiale eingefärbt.

Bei der Verbindung **MI-1148** wurde das in natürlichen Substraten vorkommende Arginin in P1-Position durch 4-Amidinobenzylamid ausgetauscht. Dieser Rest ragt, begrenzt durch die

Aminosäuren Ser253 - Asp258 auf der einen und Ser293 - Asn295 auf der anderen Seite, tief in die S1-Tasche des Enzyms. Das Amidin bildet H-Brücken zu den Carbonyl-Sauerstoffen des Pro256 und Ala292 sowie eine Salzbrücke zur Seitenkette des Asp306 aus. Zusätzlich bildet der planare Phenylring zahlreiche Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den umgebenden Resten Ser253 - Gly255 und Ser293 - Asn295 aus. Wie im Fall der Kristallstruktur des murinen Furins mit dem CMK-Inhibitor, wird die S1-Bindetasche durch ein konserviertes Ca^{2+} -Ion stabilisiert, welches pentagonal-bipyramidal durch die Seitenketten der Aminosäuren Asp258, Glu331 ($2\times$) und Asp301 sowie drei Wassermolekülen koordiniert wird (Abbildung 27). Im Gegensatz zur tiefen S1-Tasche, liegt die P2-Bindetasche in einer leichten Vertiefung der Enzymoberfläche, in der die Seitenkette des Arginins liegt. Die Guanidinofunktion bildet eine Salzbrücke zur Carboxylgruppe des Asp154, eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zum Asn192 sowie eine Wasser-vermittelte H-Brücke zu Asp228 aus. Neben der Guanidinofunktion geht auch das Peptidrückgrat eine wasserüberbrückte Wechselwirkungen mit den Furinresten Asn295 ein. Die Positionen des P3- und des P4-Rests zeigen eine ähnliche Konformation wie in der Kristallstruktur des CMK-Inhibitors in mFurin. Der Carbonylsauerstoff und das Amid NH des P3-*tert*-Leucins bilden zwei Wasserstoffbrücken zu Gly255 des Furins aus. Die Tle-Seitenkette in P3-Position ragt aus Enzymoberfläche in Richtung des Lösungsmittels. Die Seitenkette des P4-Arginins liegt in einer flachen und lösungsmittelorientierten Tasche und wird durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu Glu236, Asp264 und Tyr308 stabilisiert. Die Guanidinomethylgruppe in Position P5 des Inhibitors befindet sich parallel zu der Peptidbindung von Thr232 mit Asp233 und ist an einer Salzbrücke zu Glu236 beteiligt. Weitere Wasserstoffbrücken werden zu dem Carbonyl-Sauerstoff des Val231 und einem überbrückendem Wassermolekül ausgebildet. Dieses Wassermolekül wird durch Wechselwirkungen zu Asp233, Glu236 und dem Amid-Stickstoff des Ala267 stabilisiert. Interessanterweise sind die beiden positiv-geladenen Guanidinogruppen der P4- und P5-Reste nur etwa 4 Å voneinander entfernt, jedoch ermöglicht das stark negative Potential der Bindetasche diesen ungewöhnlichen Bindungsmodus.

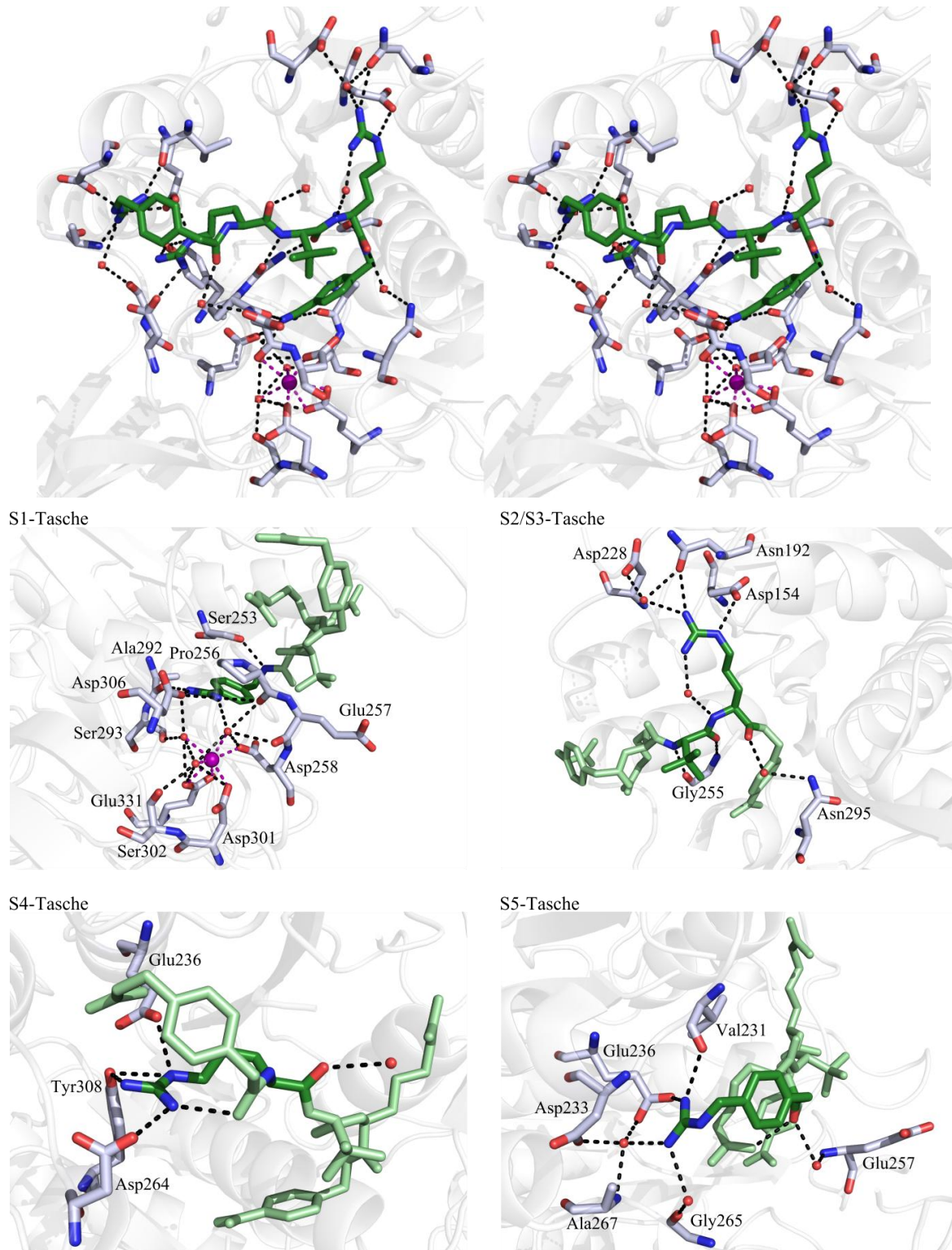


Abbildung 27: Darstellung des aktiven Zentrums des Furins im Komplex mit dem Inhibitor MI-1148 (Stab-Modell, Kohlenstoff grün, Stickstoff blau und Sauerstoff rot). Die Aminosäuren, die Wechselwirkungen mit dem Inhibitor eingehen, sind im Stab-Modell abgebildet (Kohlenstoff grau, Stickstoff blau und Sauerstoff rot). Die restlichen Aminosäuren sind aus Gründen der Übersichtlichkeit im Cartoon-Style dargestellt, Wassermoleküle sind als rote und das Ca^{2+} -Ion am Boden der S1-Tasche als violette Kugel gezeigt. Die ausgebildeten Wechselwirkungen bis zu einer maximalen Länge von 3,3 Å sind als gestrichelte schwarze Linien dargestellt. Oben: Stereoabbildung des Komplexes mit allen polaren Wechselwirkungen. S1-Tasche: 4-Amidinobenzylamid bindet an Pro256, Asp306, Ala292 und Asp258 aus, die Tasche wird durch ein pentagonal-bipyramidal komplexiertes Ca^{2+} -Ion stabilisiert. S2/3-Tasche: Die Seitenkette des Arginins bindet an Asp154, Asn192 und wasserverbrückt an Asp228. Das P3-*tert*-Leucin *backbone* 3 geht zwei Wechselwirkungen mit dem Gly255 ein. S4-Tasche: Die Guanidinofunktion des Arg bindet an die Aminosäuren Glu236, Asp264 und Tyr308. S5-Tasche: Die Guanidinomethylgruppe in para-Position des P5-Phenylrings interagiert mit Val231 und Glu236 und über zwei Wassermoleküle mit Asp233, Ala267 und Gly265.

Neben **MI-1148** liegt auch eine Kristallstruktur des Inhibitors **MI-0052** (3-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-4-Amba) im aktiven Zentrum des humanen Furins mit einer Auflösung von 2,3 Å vor (PDB: 4OMC). Im Gegensatz zu Inhibitor **MI-1148** besitzt **MI-0052** ein Val in P3-Position und die Guanidinomethylgruppe in meta-Position des P5-Phenylrests. Abbildung 28 zeigt den Vergleich des Bindungsmodus der P5-Reste der beiden Inhibitoren.

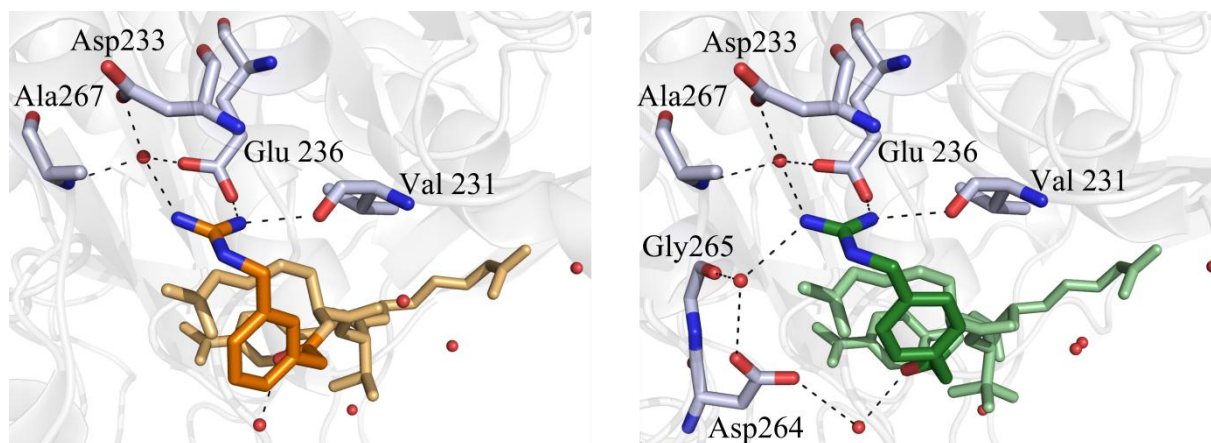


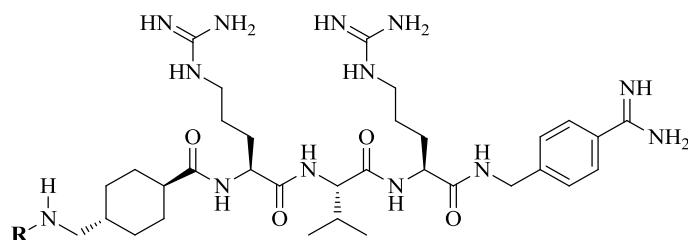
Abbildung 28: Vergleich der Kristallstrukturen des hFurins mit Inhibitor MI-0052 (links) und MI-1148 (rechts). Es wurden nur die Wechselwirkungen des P5-Rests mit einer maximalen Länge von 3,6 Å dargestellt. Die Aminosäuren des Furins (Kohlenstoff grau, Stickstoff blau und Sauerstoff rot) die Wechselwirkungen mit dem jeweiligen Hemmstoff eingehen sowie die Inhibitoren (Kohlenstoff gelb, Stickstoff blau und Sauerstoff rot) sind im Stab-Modell dargestellt.

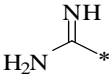
Trotz unterschiedlicher Substitutionsmuster am P5-Rest werden von den Guanidinomethyl-Resten in meta- und para-Position analoge Wechselwirkungen mit ähnlichen Abständen zu den Furinresten Glu236 und Val231 sowie einem verbrückendem Wassermolekül ausgebildet. In der Kristallstruktur mit dem Inhibitor **MI-1148** liegt eine weitere Wechselwirkung zu einem Wassermolekül vor, die in der Kristallstruktur mit der Verbindung **MI-0052** nicht zu sehen ist. Der ähnliche Bindungsmodus im P5-Bereich könnte eine Erklärung für die fast identischen picomolaren K_i -Werte beider Inhibitoren sein. Befindet sich die Guanidinomethyl-Gruppe in ortho-Position, sind diese Wechselwirkungen vermutlich nicht mehr möglich, wodurch die ca. 10-fach schwächere Hemmkonstante des Inhibitors **MI-0728** (2-GMe-Phac-Arg-Val-Arg-4-Amba) erklärbar ist.¹⁵³

3.3. Einbau der Tranexamsäure als P5-Rest

Die Kupplung von 4-Aminomethylphenylelessigsäure in P5-Position und der Aufbau der Guanidinofunktion aus diesem Amin führten zu Verbindungen mit K_i -Werten im niedrigen picomolaren Bereich. Allerdings handelt es sich bei dem für die Synthese verwendeten Baustein Boc-4-Aminomethylphenylelessigsäure um eine verhältnismäßig teure Chemikalie. Als mögliche Alternative wurde Tranexamsäure (*trans*-4-(Aminomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure) in dieser Position eingebaut. Dafür wurde zunächst das Amin der Tranexamsäure mit einer Boc-Gruppe geschützt. Die weitere Synthese der Verbindungen erfolgte dann mittels automatischer SPPS analog der Derivate **MI-1136** und **MI-1148**. Die N-terminale Aminogruppe des Tranexamsäurerests der Verbindung **MI-1130** wurde mit Pyrazolcarboxamidin \times HCl in ein Guanidin überführt (**MI-1131**). In ersten enzymkinetischen Messungen zeigte sich, dass auch diese Derivate sehr wirksame Hemmstoffe des Furins sind. Aus diesem Grund wurden die Hemmkonstanten der Verbindungen unter *tight-binding* Bedingungen ermittelt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Synthetisierte Tranexamsäurederivate. Die Messungen erfolgten unter *tight-binding* Bedingungen mit Substrat **MI-0730** (12,5 μ M im Ansatz). (n = 3).



| MI-Nummer | R | K_i -Wert (pM) |
|-------------|---|------------------|
| 1130 | H | 91,3 \pm 15,5 |
| 1131 |  | 57,6 \pm 10,7 |

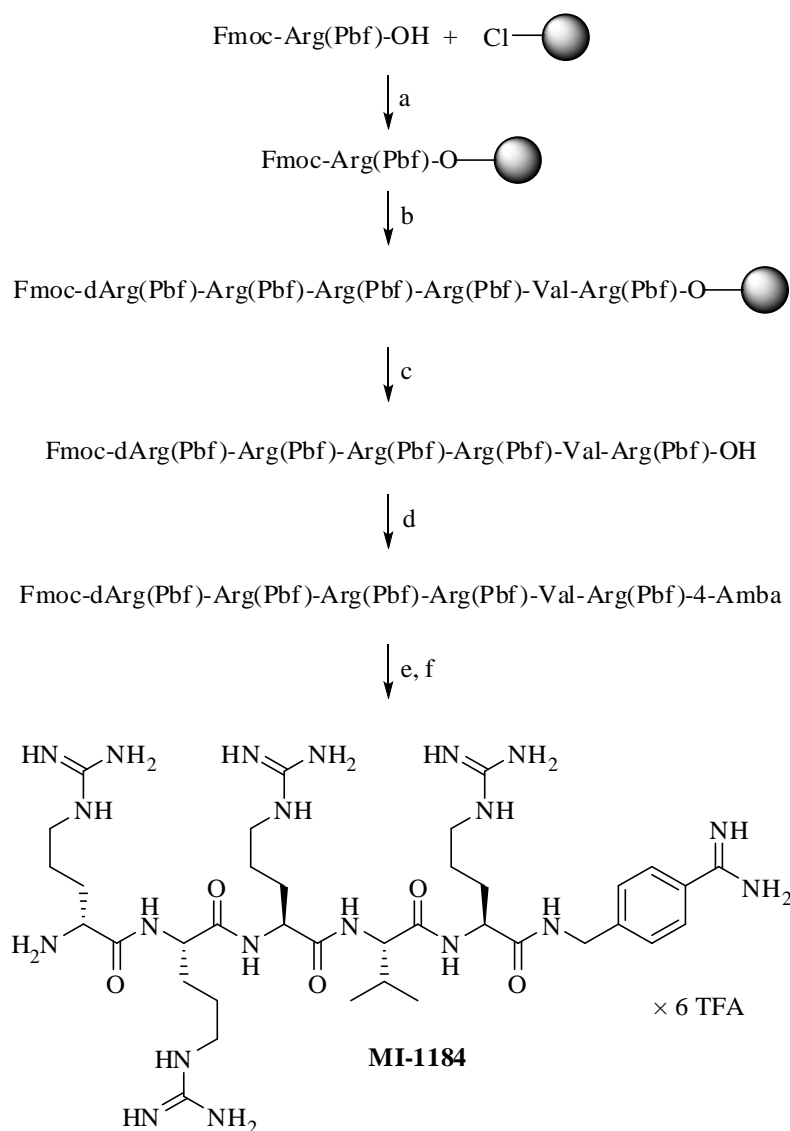
Die Verbindungen **MI-1130** und **MI-1131** sind mit K_i -Werten zwischen 50 – 100 pM weniger wirksam als einige der Derivate mit einem basischen-substituiertem Phenylacetylrest in P5-Position. Vermutlich kann die Guanidinomethylgruppe am kürzeren Cyclohexylrest nicht die gleichen optimalen Wechselwirkungen eingehen wie im Fall der substituierten Phenylelessigsäurederivate **MI-1148** oder **MI-0052**. Ähnlich wie bei den Phenylacetyl-Analoga **MI-1136** und **MI-1148** besitzt das P5-Aminderivat **MI-1130** eine etwas schwächere

Hemmung von 91,3 pM als das Guanidin-Analogon **MI-1131** mit einer Hemmkonstante von 57,6 pM. Obwohl der Einbau der Tranexamsäure in P5-Position zu wirksameren Inhibitoren im Vergleich zu Derivaten mit unsubstituierten Phenylacetylresten führt, zeigen diese Verbindungen eine schwächere Hemmwirkung verglichen mit den 4-Amino- bzw. 4-Guanidinomethylphenylacetyl-Derivaten.

3.4. Derivate mit N-terminalem D-Arg-Resten

Die Verbindungen mit Guanidinomethyl-substituiertem Phenylacetylrest in P5-Position sind die bisher wirksamsten Furininhibitoren. In der folgenden Serie wurde das P4-P1-Segment Arg-Val-Arg-4-Amba N-terminal mit weiteren Argininen in L- und/oder D-Konfiguration modifiziert. Anders als bei den zuvor beschriebenen Inhibitoren besitzen diese Verbindungen N-terminal eine freie Aminogruppe. Um den Abbau der Verbindungen durch Aminopeptidasen zu verhindern, wurde außer bei der Referenzverbindung **MI-1158**, N-terminal ein D-Arg-Rest eingebaut, da solche Peptide von Aminopeptidasen kaum mehr gespalten werden. Eine ähnliche Strategie wurde bei der Entwicklung des Decapeptidwirkstoffs Icatibant, einem Antagonisten des Bradykinin B2-Rezeptors zur Behandlung des vererbaren Angioödems, angewendet.^{154; 155}

Die Synthese der Verbindungen wurde wieder am 2Cl-Trt-Cl-Harz mittels automatischer Festphasenpeptidsynthese durchgeführt (Schema 3). Das Peptid wurde unter Erhalt der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe und der Seitenkettenschutzgruppen mild sauer vom Harz abgespalten. Im Anschluss wurde C-terminal der 4-Amba-Rest gekuppelt, gefolgt von der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 10 % Diethylamin in DMF. Im finalen Schritt wurden die restlichen Seitenkettenschutzgruppen unter stark sauren Bedingungen entfernt. Die finalen Inhibitoren wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.



Schema 3: Synthese des Inhibitors MI-1184 am 2Cl-Tritylchloridharz. Reagenzien und Bedingungen: (a) Beladung des 2Cl-Tritylchlorid-Harz mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 4 eq DIPEA, in trockenem DCM, 2 h; *capping* mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1, (v/v/v)), 3 × 1 min; (b) Fmoc-SPPS, Doppelkupplungen, in DMF; (c) 1 % TFA in DCM, 3 × 30 min; (d) 1,5 eq 4-Amidinobenzylamin × 2 HCl, 1,1 eq PyBOP, 3 eq 6-Cl-HOBt, 3 eq DIPEA in DMF, 2 h; (e) Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe mit 10 % Diethylamin in DMF, 2h; (f) Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen mit TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5, v/v/v) 3 h, 35 °C, Präzipitation in kaltem Diethylether und Reinigung mittels präparativer HPLC. Nach der Lyophilisation wurden die finalen Verbindungen als TFA-Salze erhalten.

Die synthetisierten Inhibitoren dieser Serie unterscheiden sich sowohl in ihrer Länge als auch in der Konfiguration der Argininreste. Das Derivat **MI-1158** wurde als Referenzverbindung hergestellt und enthält in den Positionen P4 – P6 drei Argininreste in L-Konfiguration. Vermutlich ist dieser Inhibitor in Zellkulturversuchen oder *in vivo* rasch durch Aminopeptidasen abbaubar. Eine Instabilität reiner L-konfigurierter peptidischer Furinhemmstoffe wurde auch in früheren Arbeiten beobachtet.¹¹⁴

Die analoge Verbindung **MI-1184** besitzt in P6-Position ein D-Arginin und sollte damit vor Abbau durch Aminopeptidasen geschützt sein. Das Derivat **MI-1185** enthält sowohl in der

P5- als auch in der P6-Position einen D-Arg-Rest. Die Verbindungen **MI-1186** und **MI-1187** wurden ausgehend von **MI-1185** mit einem bzw. zwei Argininen in D-Konfiguration verlängert.

Tabelle 6 zeigt die synthetisierten Verbindungen dieser Serie mit den bestimmten K_i -Werten.

Tabelle 6: Synthetisierte Derivate mit den bestimmten K_i -Werten. (n = 3)

| MI-Nummer | Sequenz | K_i -Wert (pM) | r^2 * |
|-------------|--|------------------|---------|
| 1158 | H-Arg-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba | $33,7 \pm 1,3$ | 0,987 |
| 1184 | H-dArg-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba | $28,3 \pm 9,7$ | 0,991 |
| 1185 | H-dArg-dArg-Arg-Val-Arg-4-Amba | $51,0 \pm 6,7$ | 0,988 |
| 1186 | H-dArg-dArg-dArg-Arg-Val-Arg-4-Amba | $75,4 \pm 10,6$ | 0,987 |
| 1187 | H-dArg-dArg-dArg-dArg-Arg-Val-Arg-4-Amba | $94,3 \pm 24,3$ | 0,979 |

* Der Determinationskoeffizient r^2 ist ein Maß der Statistik für die Güte einer Anpassung der Messdaten an die berechnete Kurve.

In ersten enzymkinetischen Messungen zeigten diese Verbindungen eine sehr starke Furinhemmung. Aus diesem Grund wurden die K_i -Werte unter *tight-binding* Bedingungen bestimmt. Jedoch war eine korrekte Anpassung der Messwerte an die Gleichung für *tight-binding* Inhibitoren (Formel 5, Abschnitt 5.2.1.3) nicht möglich. Besonders in der sogenannten Ellenbogen-Region (*elbow-region*) weichen die Messwerte von der berechneten Kurve ab (Abbildung 29). Ursache könnte eine ungenaue Inhibitor- oder Enzymkonzentration sein, die bei der Kurvenanpassung berücksichtigt werden müssen. Aus diesem Grund wurden die Inhibitoren elementaranalytisch untersucht, basierend auf dem Stickstoffverhältnis wurde ein Peptidgehalt von ca. 90 % bestimmt. Für die Auswertungen der enzymkinetischen Messungen wurde die Inhibitorkonzentration um diesen Faktor korrigiert. Zur Kontrolle der Enzymkonzentration wurde auf jeder Mikrotiterplatte Messung die Referenzverbindung **MI-0701** parallel vermessen. Mithilfe dieser Verbindung war es möglich, die jeweilige Enzymkonzentration durch Anpassung an den linearen Teil der *tight-binding* Kurve bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen zu bestimmen, wobei der Schnittpunkt mit der Abzisse die Enzymkonzentration liefert. Ein weiterer Grund könnte eine Abweichung vom angenommenen Bindungsmodus sein. Eine genaue Ursache für die nicht korrekte Anpassung der Messdaten an die Gleichung für eine reversible Hemmung durch *tight-binding* Inhibitoren konnte nicht ermittelt werden.¹⁴⁶ Aufgrund der visuellen Abweichung der Kurve von den

Messwerten wurden in Tabelle 6 zusätzlich die Determinationskoeffizienten r^2 angegeben, der trotz der Abweichungen in allen Fällen $\geq 0,979$ war.

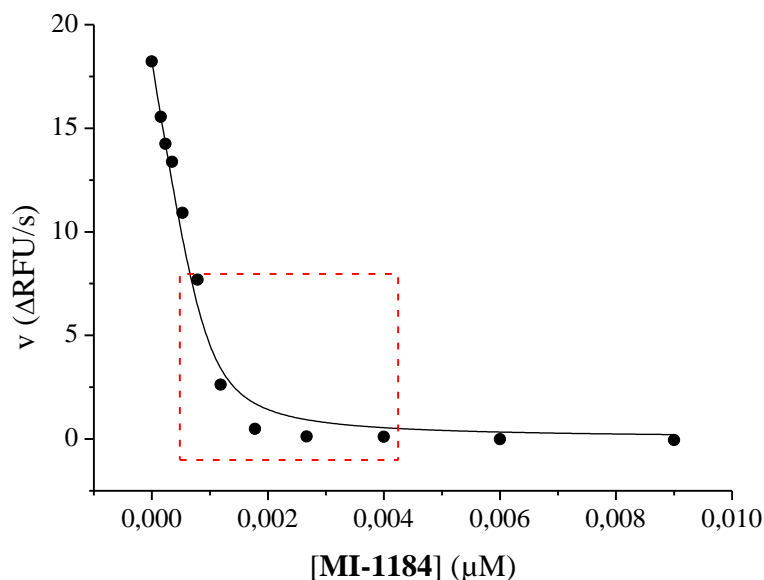


Abbildung 29: Furinhemmung durch Inhibitor MI-1184. Die Messdaten wurden an die Gleichung für eine reversible Hemmung durch *tight-binding* Inhibitoren (Formel 5, Abschnitt 5.2.1.3) angepasst. Die Messungen wurden mit dem Substrat **MI-0730** bei einer Konzentration von 12,5 μM im Ansatz durchgeführt. Die berechnete Kurve weicht in der *elbow-region* (roter Bereich) von den Messdaten etwas ab ($r^2 = 0,991$).

Die K_i -Werte der Derivate **MI-1158** und **MI-1184** mit einem L-Arg-Rest in P5-Position zeigen eine etwas stärkere Hemmung als die Verbindungen mit D-Arginin. Wahrscheinlich führt der Einbau des D-Arginins zu einer veränderten Rückgratkonformation und Ausrichtung der basischen Seitenkette, wodurch weniger optimale Wechselwirkungen im aktiven Zentrum möglich sind.

Aufgrund der dennoch starken Furinhemmung im subnanomolaren Bereich wurden diese Verbindungen auf die Hemmung der Ausbreitung von HPAIV untersucht (Abschnitt 3.1.7). Zuvor wurde die Zytotoxizität der Derivate auf MDCK II-Zellen wiederum mit dem MTT-Test untersucht.¹⁵⁰ Abbildung 30 zeigt die Viabilität der verwendeten MDCK II-Zellen nach Inkubation mit den Verbindungen über einen Zeitraum von 24 und 48 h. Insgesamt zeigen die Inhibitoren eine vernachlässigbare Zytotoxizität, nur das Derivat **MI-1187** besitzt eine geringe Toxizität. Interessanterweise ist **MI-1187** mit sieben basischen Guanidino- und/oder Amidinogruppen sowie einem freien N-Terminus die am stärksten basische Verbindung dieser Serie.

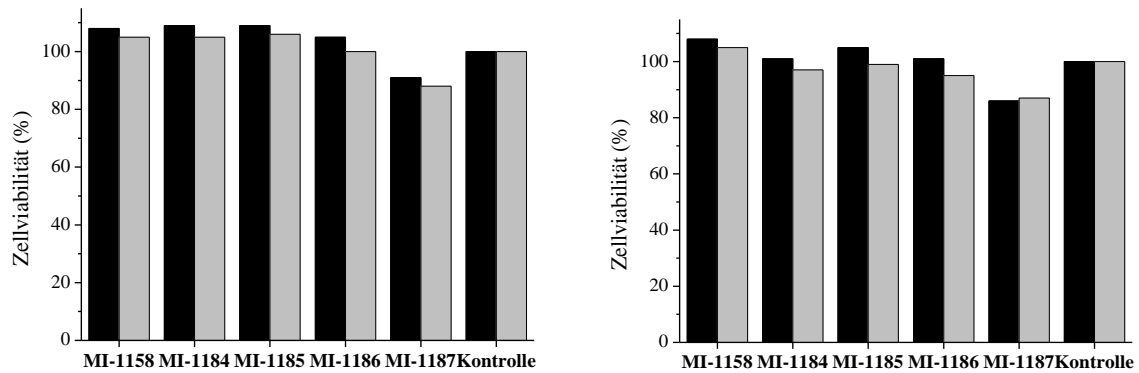


Abbildung 30: Bestimmung der Zytotoxizität der Inhibitoren auf MDCK II-Zellen mithilfe des MTT-Assays nach Inkubation über 24 h (schwarz) und 48 h (hellgrau). Die Inhibitorkonzentration im Assay betrugen 25 μM (links) und 50 μM (rechts). Als Kontrolle wurden Zellen ohne Inhibitorzugabe identisch behandelt und das Ergebnis auf 100 % skaliert.

Anschließend wurde in Zellkultur untersucht, ob die Vermehrung hochpathogener Influenzaviren durch diese Verbindungen gehemmt werden kann. Abbildung 31 zeigt die Ausbreitung des H7N1-Subtyps in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen.

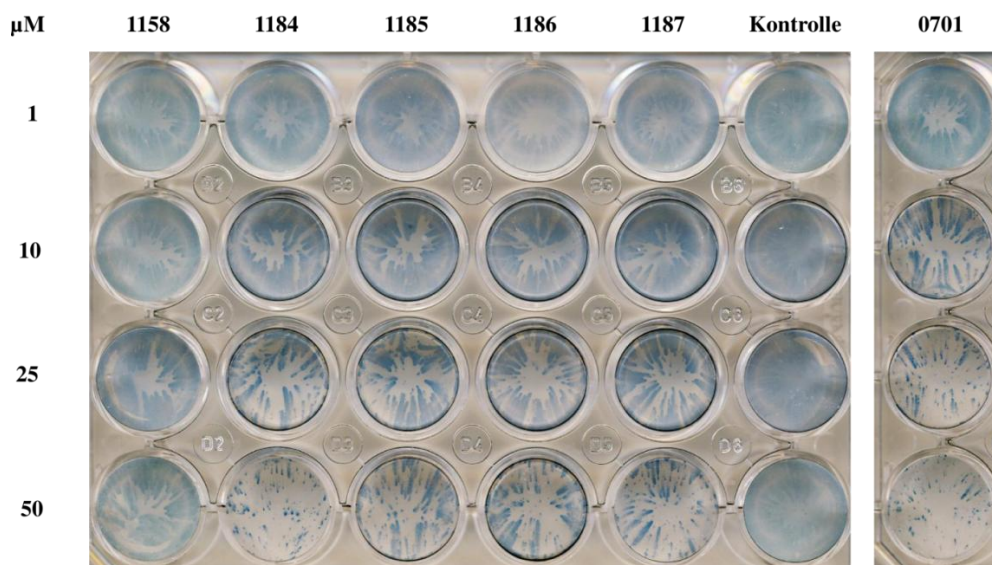


Abbildung 31: Hemmung der Virusausbreitung in MDCK II-Zellen. MDCK II-Zellen wurden mit FPV (H7N1) bei einer MOI von 0,001 infiziert. Eine Stunde später wurden die Zellen gewaschen und mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen (1 - 50 μM) versetzt. Nach Inkubation über 24 h bei 37 °C wurden die infizierten Zellen mit PFA fixiert. Die infizierten Zellen wurden mit Hase-anti-FPV-Antikörpern und HRP-gekoppeltem Esel-anti-Hase-Antikörpern sowie der anschließenden Umsetzung des True Blue Peroxidase Substrats (KPL, Gaithersburg, MD, Vereinigte Staaten) angefärbt.

Die Derivate mit einem N-terminalen D-Arg-Rest, **MI-1184**, **MI-1185**, **MI-1186** und **MI-1187**, führen zu einer sichtbaren Hemmung der Virusausbreitung bis zu einer Konzentration von etwa 25 μM . Insgesamt ist der Effekt jedoch geringer als bei der Referenzverbindung **MI-0701**, die die Virusausbreitung bis zu einer Konzentration von 10 μM sichtbar hemmt.

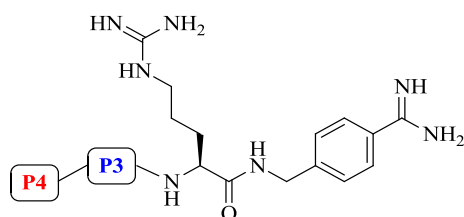
Die Verbindung **MI-0701** wurde am gleichen Tag auf einer anderen Platte getestet. Das Derivat **MI-1158** mit L-Arg in den Positionen P5 - P6 beeinflusst die Virusausbreitung kaum, obwohl der K_i -Wert im gleichen Bereich wie der der Verbindung **MI-1184** liegt. Ein möglicher Grund könnte die geringere Stabilität der Verbindung in Zellkultur sein.

3.5. Inhibitoren ohne P5-Rest

Bei der weiteren Optimierung wurde versucht, wirksame Inhibitoren ohne P5-Rest zu entwickeln, um das Molekulargewicht der Verbindungen zu reduzieren. Aus diesem Grund wurden für das Arginin in P4-Position unterschiedliche basische Gruppen eingebaut. Bei den Inhibitoren **MI-0059** und **MI-0060** wurde das P3-P1-Segment (Val-Arg-4-Amba) beibehalten und als P4-Rest 3- bzw. 4-Aminomethylphenylelessigsäure gekuppelt. Die N-terminale Benzylaminstruktur wurde wiederum in die Guanidinbenzylamine umgewandelt (**MI-0061** und **MI-0062**).

Zur Synthese des Inhibitors **MI-1135** wurde Boc-5-Aminopentansäure als P4-Rest gekuppelt, die mit 4 Methylengruppen die gleiche Kettenlänge wie eine Argininseitenkette hat. Die terminale Aminogruppe wurde ebenfalls in ein Guanidin überführt, da aus früheren Arbeiten bekannt war, dass wirksame Furininhibitoren eine Guanidinogruppe in der P4-Seitenkette benötigen. Verbindung **MI-1135** wurde ebenfalls guanyliert um eine Argininseitenketten-Analogon zu erhalten (**MI-1146**). Bei den Inhibitoren **MI-1151** und **MI-1152** handelt es sich um die Analoga der Verbindungen **MI-1135** und **MI-1146** mit Tle in P3-Position.

Tabelle 7: Furinhemmung durch die Inhibitoren ohne P5-Rest. (n = 3)



| MI-Nummer | P4 | P3 | K _i -Wert (nM) |
|-----------|----|-----|---------------------------|
| 0059 | | Val | 48,2 ± 13,6 |
| 0060 | | Val | 37,8 ± 12,8 |
| 0061 | | Val | 164,0 ± 21,2 |
| 0062 | | Val | 269,3 ± 25,6 |
| 1135 | | Val | 38,5 ± 2,9 |
| 1146 | | Val | 2,5 ± 0,3 |
| 1151 | | Tle | 26,7 ± 0,9 |
| 1152 | | Tle | 1,26 ± 0,1 |

Die Derivate mit 3- oder 4-Aminomethylphenylacetyl-Rest in P4-Position (**MI-0059** und **MI-0060**), zeigen mit K_i-Werten von 48,17 nM und 37,80 nM eine deutlich reduzierte Furinhemmung im Vergleich zu **MI-0227** mit dem Phenylacetylrest in Position P5 und Arginin in P4-Position. Der Aufbau eines Guanidins aus dem N-terminalen Armin führte,

anders als im Fall der *tight-binding* Inhibitoren **MI-1136** und **MI-1148**, nicht zu einer Verbesserung der Hemmkonstanten dieser Verbindungen, sondern zu einem weiteren Affinitätsverlust. Ein möglicher Grund könnte sein, dass die Guanidinomethylgruppe am rigideren Phenylring nicht mehr die charakteristische Position wie im Fall der Argininseitenkette einnehmen kann. Der Einbau der 5-Aminopentansäure in P4-Position in Verbindung **MI-1135** führt zu einer ähnlichen Hemmwirkung wie bei den Derivaten mit dem Aminomethylphenylacetyl-Rest. Die Umwandlung der terminalen Aminogruppe in ein Guanidin bewirkt jedoch eine deutliche Verbesserung der Hemmwirkung (K_i -Wert: 2,54 nM). Aufgrund der relativ starken Hemmwirkung des Inhibitors **MI-1146** wurde durch Austausch des P3-Valins durch Tle versucht, die Furinhemmung noch weiter zu verstärken. Beide Tle-Derivate **MI-1151** und **MI-1152** zeigen eine etwas stärkere Affinität zu Furin als ihre direkten Val-Analoga.

Die beiden wirksamsten Verbindungen dieser Serie wurden auf ihre Schutzwirkung gegen Anthraxtoxin in murinen Makrophagen untersucht. Die Experimente wurden, wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, im Arbeitskreis von Prof. Beyer durchgeführt. Abbildung 32 zeigt die Schutzwirkung der Inhibitoren **MI-1146** und **MI-1152** und der Referenzverbindungen **MI-0227** und **MI-1116** über einen Konzentrationsbereich von 0,5 – 100 μ M.

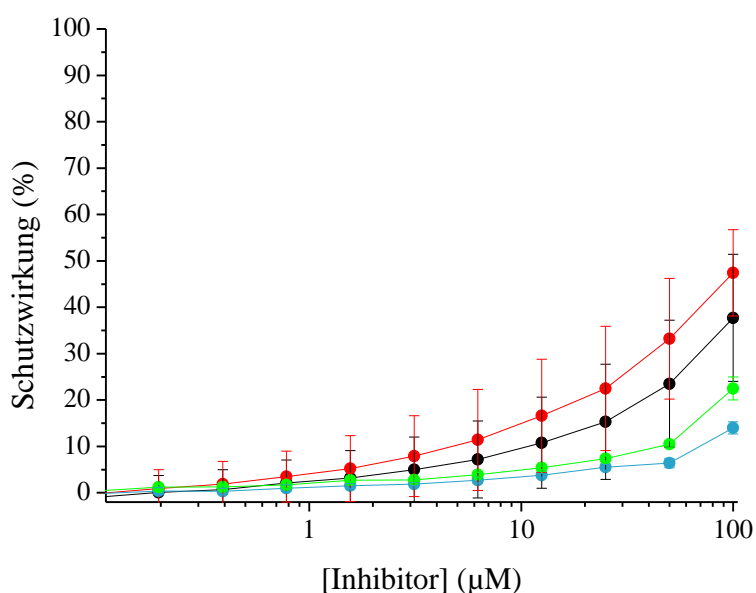


Abbildung 32: Schutzwirkung ausgewählter Inhibitoren gegen Anthraxtoxin in murinen Makrophagen. Die Zellen wurden mit 500 ng/ml PA und 100 ng/ml LF in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen der Inhibitoren **MI-0227** (●), **MI-1116** (●), **MI-1146** (●) und **MI-1152** (●) versetzt. (n = 3)

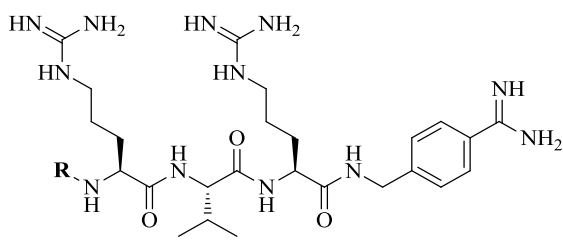
Die Verbindungen **MI-1146** und **MI-1152** zeigen einen konzentrationsabhängigen Effekt gegen Anthraxtoxin. Bei einer Konzentration von 100 μM hat der Inhibitor **MI-1146** eine Schutzwirkung von etwa 14 % und die Verbindung **MI-1152** von etwa 23 %. Diese Werte korrelieren auch in diesem Fall mit den bestimmten K_i -Werten der Verbindungen. Die beiden kürzeren Derivate ohne P5-Rest (**MI-1146** und **MI-1152**) weisen mit 2,54 nM und 1,26 nM eine schlechtere Hemmung im enzymkinetischen Assay als die Inhibitoren mit einem P5-Phenylacetyl-Rest auf. Die beiden verkürzten Derivate zeigen nur eine etwa halb so starke Schutzwirkung im Vergleich zu den längeren Inhibitoren mit P5-Rest.

3.6. Verlängerte Derivate mit N-terminalem Phenylacetylrest

Wie bereits erwähnt enthalten viele Furinsubstrate auch in den Positionen P5 – P8 basische Aminosäuren. Im Vergleich zur zuvor beschriebenen Serie, wurde bei diesen Furinhemmstoffen nur Aminosäure in L-Konfiguration eingebaut und der N-Terminus mit dem Phenylacetylrest acetyliert, um den Abbau durch Aminopeptidasen einzuschränken. Auch sollten diese Derivate für Kristallisationsexperimente genutzt werden, um die genauen P5- und P6-Substratbindetaschen des Furins experimentell zu identifizieren, die bisher nur durch *modeling* vorhergesagt wurden.

Die Verbindungen besitzen die Grundstruktur Phac-(Arg)_x-Val-Arg-4-Amba synthetisiert, wobei x für 2 (**MI-1102**) oder 3 (**MI-1103**) steht. Bei den Verbindungen **MI-1104** und **MI-1105** wurde jeweils ein Arg-Rest in Position P5 oder P6 durch Ala ausgetauscht, um die Bedeutung dieser Positionen hinsichtlich eines basischen Rests zu untersuchen.

In Vortests zeigte sich, dass auch diese Derivate sehr wirksame Furinhemmstoffe sind. Deshalb wurden die K_i -Werte der Verbindungen unter *tight-binding* Bedingungen ermittelt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Furinhemmung durch verlängerte Derivate mit N-terminalen Phenylacetylrest. (n = 4)


| MI-Nummer | R | K _i -Wert (pM) |
|-------------|--------------|---------------------------|
| 1102 | Phac-Arg | 56,3 ± 7,7 |
| 1103 | Phac-Arg-Arg | 13,8 ± 4,5 |
| 1104 | Phac-Arg-Ala | 45,9 ± 12,5 |
| 1105 | Phac-Ala-Arg | 49,1 ± 19,2 |

Die Verbindung **MI-1103** mit drei Arg-Resten in den Positionen P4 – P6 ist mit einer Hemmkonstante von 13,8 pM das potenteste Derivat dieser Serie und auch stärker wirksam als die verlängerten Inhibitoren mit D-Arg-Resten (Tabelle 6). Die starke Hemmwirkung bestätigt Ergebnisse aus früheren Studien mit reinen peptidischen Inhibitoren, wo Furin basische Reste in P5- und P6-Position bevorzugte. Die Derivate **MI-1104** und **MI-1105**, bei denen jeweils ein Arginin gegen Alanin ausgetauscht wurde, hemmen Furin mit vergleichbaren K_i-Werten von 45,9 bzw. 49,1 pM, sind jedoch weniger wirksam als der Hemmstoff **MI-1103**. Auch Inhibitor **MI-1102** hemmt Furin in einem ähnlichen Bereich (K_i-Wert: 56,26 pM). Wie bereits zuvor für die ungeschützten Derivate mit D-Arg-Resten (Tabelle 8), bewirkt die Verlängerung des peptidischen Inhibitors Phac-Arg-Val-Arg-4-Amba (**MI-0227**) durch den Einbau weiterer Arginine in den Positionen P5 – P6 eine deutliche Verbesserung der Hemmwirkung. Die Verbindungen sind allerdings weniger wirksam als das Derivat **MI-0701** mit einem 4-Guanidinomethylphenylacetylrest in Position P5. Da diese substratanalogen Inhibitoren nur aus L-Aminosäuren aufgebaut sind, wurden sie für Kristallisationsversuche mit Furin verwendet, um den Bindungsmodus der S5- und S6-Tasche zu bestimmen. Dabei wurde versucht aus Komplexen des Furins mit Inhibitor **MI-0052** den Liganden durch *soaking* mit Inhibitoren dieser Serie auszutauschen. In diesen Kristallen konnte jedoch keine Elektronendichte im Bereich der P5- und P6-Reste identifiziert werden.

3.7. Einbau des Glutaminsäurerests in P3-Position

In einem Mausexperiment zeigte die Verbindung Ac-RARRRKK-4-Amba im Vergleich zu analogen Derivaten ohne Benzamidinstruktur eine erhöhte Toxizität; toleriert wurde noch eine Dosis von 7 – 10 mg/kg.¹¹⁶

In der Wirkstoffentwicklung wurden in einigen Fällen schwerwiegende Nebenwirkungen mit Arginin- oder Argininmimetika enthaltenen Verbindungen beobachtet. Boroargininderivate als Thrombininhibitoren führten durch die Hemmung des Komplementfaktors I zu Hypotonie und erhöhten Serumtransaminasespiegeln.¹⁵⁶ Im Rahmen der Entwicklung von Benzamidinderivaten als Hemmstoffe des Gerinnungsfaktors FXa wurde für einige Derivate eine Hemmung des hERG (*human ether-a-go-go-related gene*)-Kanals gezeigt.¹⁵⁷

Der hERG-Kanal wird im menschlichen Herzen exprimiert und ist ein spannungsgesteuerter Kaliumkanal, der für die teilweise Repolarisation des Herzens durch einen schnellen Kaliumausstrom während des Aktionspotentials sorgt. Die Hemmung dieses Kanals kann zu einer Verlängerung des QT-Intervals führen und die lebensgefährliche *Torsade des pointes*-Tachykardie zur Folge haben. Die Vermeidung der hERG-Inhibierung ist eine große Hürde in der Arzneimittelentwicklung. Zahlreiche Arzneistoffe, wie das Antihistaminikum Astemizol oder das Prokinetikum Cisaprid, wurden aufgrund von Interaktionen mit dem hERG-Kanal vom Markt genommen.¹⁵⁸ Die Hemmung dieses Kaliumkanals wird wahrscheinlich vor allem durch Derivate mit stark basischen Gruppen, wie Aminen oder Amidinen, hervorgerufen. Im Rahmen der Entwicklung der FXa-Hemmstoffe wurde gezeigt, dass durch den Einbau einer zusätzlichen Carboxylgruppe in vielen Fällen die Affinität zum hERG-Kanal drastisch reduziert werden konnte.¹⁵⁷

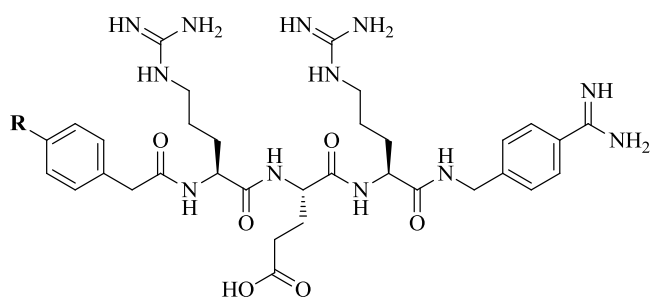
Deshalb wurden zwei Furinhemmstoffe synthetisiert, bei denen ein Glu-Rest in P3-Position eingebaut wurde, obwohl aus früheren Arbeiten mit Phenylacetylderivaten in P5-Position bereits bekannt war, dass diese Substitution zu einem ca. 125-fachen Abfall der Hemmwirkung führt.¹²⁶ Dieser starke Affinitätsverlust wurde erwartet, da das aktive Zentrum des Furins stark negativ geladen ist und die P3-Seitenkette in engen Kontakt mit der Seitenkette des Furinrests Glu257 kommen könnte. Der Einbau der Glutaminsäure an einer der anderen Positionen würde allerdings zu einem noch sehr viel drastischeren Abfall der Affinität zu Furin führen.


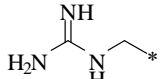
In Kombination mit einer basischen Aminomethyl- oder Guanidinomethylphenylacetylgruppe als P5-Rest, sollte der Affinitätsverlust durch den Einbau des Glutaminsäurerests in P3-

Position teilweise kompensiert werden. Die Synthese der beiden Verbindungen **MI-1183** und **MI-1188** erfolgte wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.1.3).

Wie erwartet konnte die Furininhibierung durch den Einbau der ausgewählten basisch-substituierten Reste in P5-Position deutlich verbessert werden. Für das 4-Aminomethylphenylacetyl-Derivat **MI-1183** wurde eine Hemmkonstante von 2,68 nM und für das analoge Guanidinderivat **MI-1188** ein Wert von 0,58 nM bestimmt.

Tabelle 9: Hemmung des Furins durch Inhibitoren mit Glutaminsäure in P3-Position. (n = 3)



| MI-Nummer | R | K _i -Wert (nM) |
|-------------|---|---------------------------|
| 1183 |  | 2,68 ± 0,15 |
| 1188 |  | 0,58 ± 0,02 |

Die Hemmwirkung des Guanidin-Derivats **MI-1188** liegt im Bereich der Affinität des Hemmstoffs **MI-0227**. Möglicherweise könnte durch die Verwendung eines Spacers zwischen dem Peptid und der Säuregruppe eine bessere Hemmung erreicht werden.

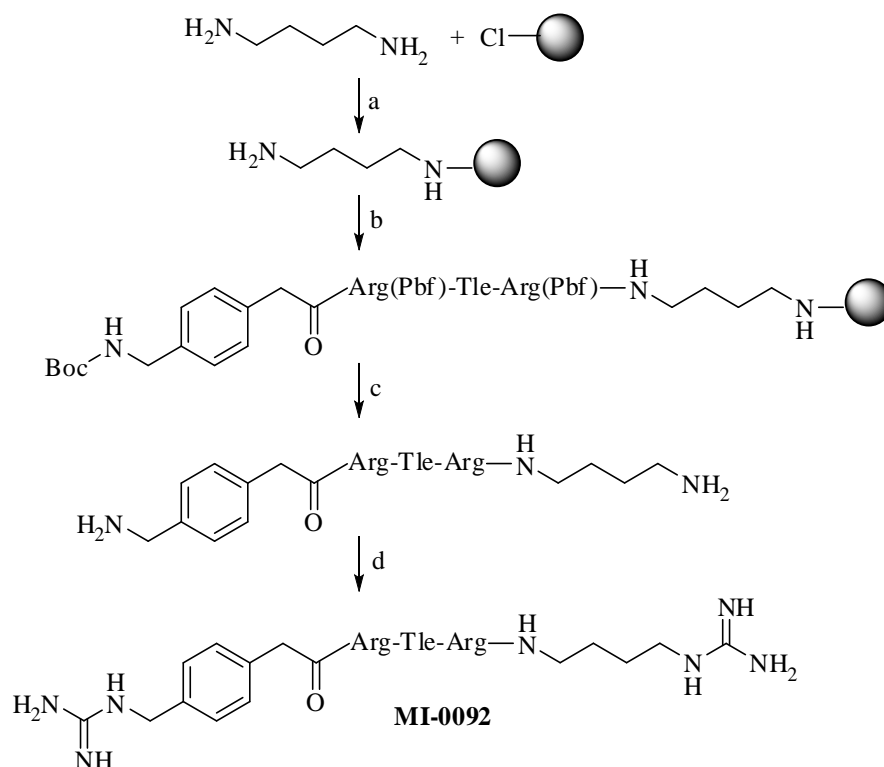
Die hERG-Affinität der Verbindungen **MI-1183** und **MI-1188** sowie weiterer Analoga müsste jedoch experimentell ermittelt werden.

3.8. Furinhemmstoffe mit Agmatin- und Noragmatinrest in P1-Position

Wie bereits erwähnt, zeigte der Furininhibitor Ac-RARRRKK-4-Amba in einem Mausexperiment eine höhere Toxizität als vergleichbare Verbindungen ohne C-terminale Benzamidingruppe.¹¹⁶ Aufgrund der starken Furinhemmung durch diesen Inhibitortyp ist es möglich, das C-terminale 4-Amidinobenzylamid durch andere Argininmimetika auszutauschen, auch wenn dadurch die Hemmwirkung etwas schwächer wird. So führte der Ersatz des 4-Amba-Rests durch die linearen Guanidin-Derivate Agmatin oder Noragmatin zu ca. 50-fach schwächeren Verbindungen.¹³⁵

Durch Kombination mit besser geeigneten P5-Resten, wie 3- oder 4-Guanidinomethylphenylacetyl-Gruppen ist es jedoch möglich, die reduzierte Hemmwirkung teilweise zu kompensieren. Aus diesem Grund wurden Verbindungen mit Agmatin und Noragmatin in P1-Position mit Tle in Position P3 und 3- oder 4-Guanidinomethylphenylacetyl-Gruppen in P5-Position kombiniert.

Zu Beginn der Synthese wurde säurelabiles Tritylchlorid Harz mit dem jeweiligen Diamin beladen. Um eine hohe Harzbeladung zu erreichen, wurde das Diamin in THF gelöst und im 4-fachen Überschuss zum Harz gegeben.¹⁵⁹ Die Suspension wurde 2 h bei RT geschüttelt bevor das Harz dreimal für je 1 min mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1, (v/v/v)) behandelt wurde, um verbliebene, reaktive Gruppen am Harz zu inaktivieren.¹⁶⁰ Nach diesem *capping* wurde das Harz mehrfach mit DMF und DCM gewaschen. Der weitere Aufbau des Peptidgrundgerüsts erfolgte analog zur Synthese der 4-Amba-Derivate am 2Cl-Tritylchloridharz durch manuelle SPPS. Die Harz- und Schutzgruppenabspaltung erfolgte mit 95 % TFA, 2,5 % TIS und 2,5 % H₂O (v/v/v). Nach 3 h wurde das Rohpeptid in kalten Diethylether präzipitiert, gewaschen und getrocknet. Mittels HPLC wurde kontrolliert, ob die Pbf-Schutzgruppen der Arginine vollständig abgespalten wurden. Bei unvollständiger Schutzgruppenabspaltung wurde das Peptid erneut für 3 h mit der 95 % TFA-Lösung versetzt, bevor es in Diethylether gefällt wurde. Die Umwandlung des N-terminalen Aminomethylphenylacetylrests und des jeweiligen Amins in P1-Position in die Guanidine erfolgte mit 1*H*-Pyrazolcarboxamidin. Die Reinigung der Rohprodukte wurde mittels präparativer HPLC durchgeführt. In Schema 4 ist die Synthese exemplarisch für Inhibitor **MI-0092** gezeigt.



Schema 4: Synthese des Furininhibitors MI-0092 mit C-terminalem Agmatinrest. Reagenzien und Bedingungen: a) Tritylchlorid-Harz, 4 eq. Diamin, abs. THF, 2h; *capping* mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1, (v/v/v)), 3×1 min; b) SPPS, Doppelkupplungen mit 4 eq AS bzw. Boc-4-AMe-Phac, HOBt und HBTU sowie 8 eq. DIPEA; c) Harz- und Schutzgruppenabspaltung mit TFA/TIS/ H_2O (95:2,5:2,5; (v/v/v)) über 3h; d) 4 eq. 1H-Pyrazolcarboxamidin \times HCl, 4 eq. DIPEA in 1 M Na_2CO_3 , über Nacht.

Die bestimmten Hemmkonstanten dieser Verbindungen sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Der Vergleich der K_i -Werte zeigt, dass die 4-Guanidinomethylphenylacetyl-Derivate **MI-0090** und **MI-0092** Furin etwa um den Faktor 2 stärker hemmen als die analogen meta-substituierten Verbindungen. Der Austausch von 4-Amidinobenzylamid durch die Agmatin-Bausteine wird durch den Einbau eines 3- bzw. 4-Guanidinomethylphenylacetyl-Rest in Position P5 teilweise kompensiert und führt zu potenten Furininhibitoren mit K_i -Werten im niedrigen nanomolaren Bereich, obwohl die Hemmwirkung verglichen mit dem wirksamsten Inhibitor **MI-1148** deutlich schwächer ist. Ob dieser Austausch des P1-Rests tatsächlich zu einer reduzierten Toxizität *in vivo* führt, ist unbekannt, da bisher noch keine Tierversuche mit diesen Verbindungen durchgeführt wurden.

Tabelle 10: Furinhemmung durch Noragmatin- und Agmatin-Derivate. Die Position der Substitution des Restes R am P5-Phenylring entspricht der angegebenen Nummerierung. (n = 3)

| MI-Nummer | R | n | K _i -Wert (nM) |
|-----------|---|---|---------------------------|
| 0089 | | 3 | 0,49 ± 0,02 |
| 0090 | | 3 | 0,28 ± 0,01 |
| 0091 | | 4 | 0,52 ± 0,07 |
| 0092 | | 4 | 0,22 ± 0,02 |

Die Wirksamkeit der Hemmstoffe gegen HPAIV wurde in Zellkulturversuchen, wie in Abschnitt 3.1.7 beschrieben, geprüft. Zuvor wurde die Zytotoxizität der Verbindungen bestimmt, wobei bis zu einer Konzentration von 50 µM im Ansatz keine toxische Wirkung auf die MDCK II-Zellen gefunden wurde (Abbildung 33).

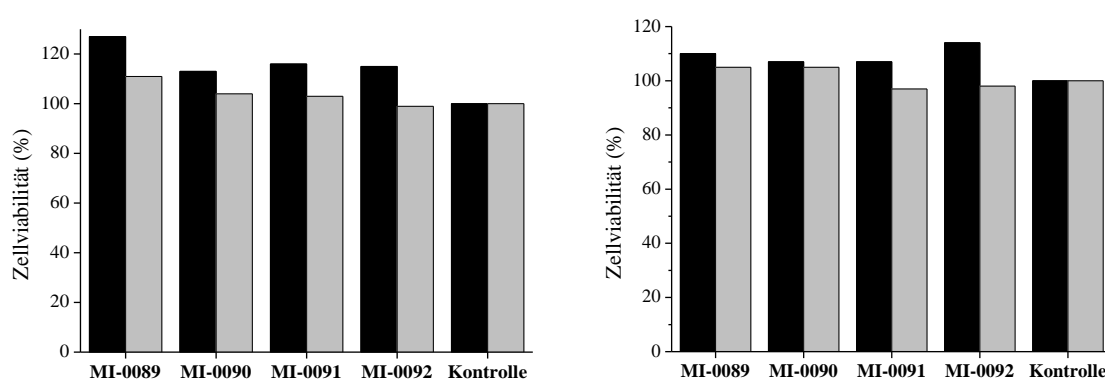


Abbildung 33: Bestimmung der Zytotoxizität der Agmatin- und Noragmatinderivate auf MDCK II-Zellen mittels MTT-Test nach der Inkubation über 24 h (schwarz) und 48 h (hellgrau). Die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen betrugen 25 (links) und 50 µM (rechts). Als Kontrolle wurden Zellen ohne Inhibitorzugabe identisch behandelt und das Ergebnis auf 100 % skaliert. Die Detektion erfolgte mittels MTT-Assay.¹⁵⁰

Daraufhin wurde der Effekt der Verbindungen auf die Ausbreitung von FPV in MDCK II-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 34 zu sehen, zeigen die Inhibitoren keinen protektiven Effekt auf die Virusausbreitung im gewählten Konzentrationsbereich im Vergleich zur Referenzverbindung **MI-0701**, die am gleichen Tag auf einer anderen Platte getestet wurde.

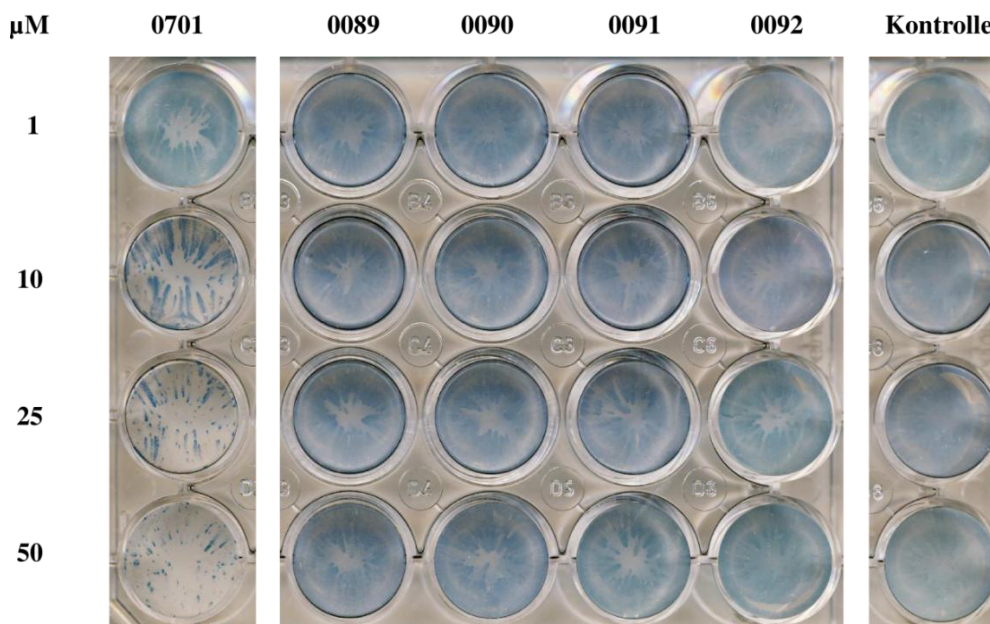


Abbildung 34: Hemmung der Virusausbreitung in MDCK II-Zellen. MDCK II-Zellen wurden mit FPV bei einer MOI von 0,001 infiziert. Eine Stunde später wurden die Zellen gewaschen und mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen (1 – 50 µM) versetzt. Nach der Inkubation über 24 h bei 37 °C wurden die infizierten Zellen mit PFA fixiert. Die infizierten Zellen wurden mit Hase-anti-FPV-Antikörpern und HRP-gekoppeltem Esel-anti-Hase-Antikörpern sowie der anschließenden Umsetzung des True Blue Peroxidase Substrats (KPL, Gaithersburg, MD, Vereinigte Staaten) angefärbt.

3.9. Modifizierung der Furinhemmstoffe mit zellpenetrierende Peptiden

Viele der synthetisierten Inhibitoren besitzen durch die Guanidino-Gruppen in den Positionen P2 und P4 sowie der C-terminalen Benzamidin-Struktur eine starke Basizität. Um die Aktivierung von an Krankheiten beteiligten Substraten durch Furin in der Zelle zu hemmen, müssen die Verbindungen in vielen Fällen sowohl die Zellmembran als auch intrazelluläre Membranen passieren. Diese Membran schützt die Zelle vor Aufnahme unbekannter Moleküle und kontrolliert durch gerichteten Im- und Export die Homöostase im Zytosol der Zelle. In der Regel können nur kleine lipophile Verbindungen mit einem Molekulargewicht < 600 Da die Zellmembran mittels passiver Diffusion passieren. Hydrophilere Verbindungen können nur durch wenige spezielle Transporter, mittels Endozytose oder durch energieunabhängige Prozesse, wie zum Beispiel direkte Translokation aufgenommen

werden.¹⁶¹ Aus diesem Grund sind Vektoren notwendig, um die Inhibitoren in die Zelle zu schleusen. Mögliche Carrier sind Liposomen, Lipide, virale Vektoren oder zellpenetrierende Peptide.¹⁶²

Zellpenetrierende Peptide (CPPs) sind in der Regel zwischen 5 - 30 Aminosäuren lang und zeichnen sich dadurch aus, dass sie Zellmembranen passieren können. Die Aminosäuresequenzen der meisten CPPs leiten sich in vielen Fällen von Membran-interagierenden Proteinen, wie Fusionspeptiden, Signalpeptiden, Transmembran-Domänen oder antimikrobiellen Peptiden, ab. CPPs werden erfolgreich als Vektoren für Oligonukleotide, Proteine oder auch andere Peptide eingesetzt.¹⁶³

Der Aufnahmemechanismus der CPPs in die Zelle wird trotz intensiver Forschung kontrovers diskutiert. Mittlerweile geht man davon aus, dass es im ersten Schritt zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den häufig kationischen CPPs und den negativ-geladenen Glykosaminoglykanen oder Heparansulfatstrukturen auf der Zelloberfläche kommt.¹⁶⁴ Die so an die Zellwand angelagerten CPPs können dann mittels unterschiedlicher endozytotischer Wege oder durch direkte Translokation in die Zelle internalisiert werden.¹⁶⁵

Zum heutigen Zeitpunkt sind CPPs verschiedener Klassen bekannt. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Synthesen wurden die gängigen CPPs Tat, Penetratin, Transportan und ein Poly-Arg-Derivat als Vektoren ausgewählt. Die kationischen CPPs Tat und Penetratin gehören zu den am häufigsten verwendeten CPPs und gelten als besonders effiziente Vektoren. Tat leitet sich vom Transkriptionsaktivatorprotein des HIV-1 ab und wurde 1989 als erstes CPP beschrieben.¹⁶⁶ Penetratin stammt aus der dritten Helix des *Drosophila* Homeoproteins Antennapedia.¹⁶⁷ Experimente mit Tat und Penetratin zeigten die Bedeutung basischer Gruppen für den Translokationsprozess. Aus diesem Grund wurden Studien mit verschiedenen kationischen Polypeptiden durchgeführt, was zur Identifizierung von Poly-Arg-Verbindungen mit zellpenetrierenden Eigenschaften führte.¹⁶⁸ Transportan gehört zu den amphipatischen CPPs und ist ein synthetisches Peptid, das sich aus dem N-terminalen Fragment des Neuropeptids Galanin und dem Wespentoxin Mastoparan zusammensetzt, die durch einen Lysin-Linker verbunden sind.¹⁶⁹

Bei den in Tabelle 11 gezeigten Strukturen wurden die CPP-Sequenzen ohne Linker N-terminal an das P1-P4-Inhibitorsegment Arg-Val-Arg-4-Amba gekuppelt. Die Verbindungen wurden durch eine Kombination von automatischer SPPS und Lösungssynthese hergestellt. Der Aufbau des Peptidgrundgerüsts sowie die C-terminale Acetylierung wurden mittels SPPS an einem mit Fmoc-Arg(Pbf) beladenem 2Cl-Trt-Cl-Harz nach einem Standardprotokoll (Abschnitt 5.3.1) durchgeführt. Nach mild saurer Harzabspaltung unter Erhalt des

Seitenkettenschutzes wurde in Lösung 4-Amba \times 2 HCl gekuppelt, anschließend wurde das Peptid vollständig entschützt und die Verbindungen mittels präparativer HPLC gereinigt.

Die enzymkinetische Charakterisierung der synthetisierten CPP-Derivate unter Verwendung des Standardassays führte zu exponentiellen Kurven in der Dixon-Auftragung, wie in Abbildung 35 für Inhibitor **MI-1143** gezeigt.

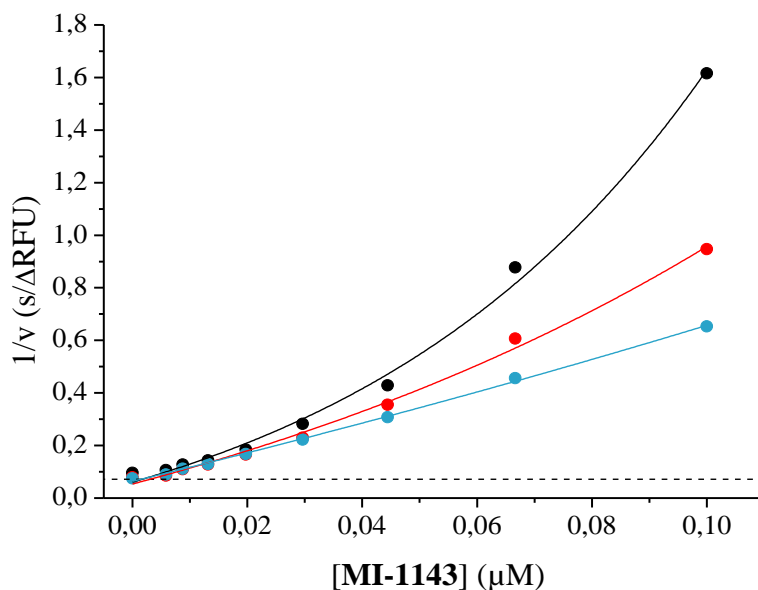


Abbildung 35: Dixon-Auftragung der Furinhemmung durch Inhibitor MI-1143 bei Substratkonzentrationen von 5 (●), 20 (●) und 50 (●) μM. Bei der gestrichelten Linie handelt es sich um $1/V_{\max}$. Nur zur Verdeutlichung der Krümmung wurden die Werte an eine Funktion für exponentielles Wachstum angepasst. Mit den anderen CPP-Derivate wurden ähnliche Dixon-Plots erhalten (nicht gezeigt).

Nicht-lineare Abhängigkeiten bei der Dixon-Auftragung sind in der Regel ein Zeichen für ein von der kompetitiven Hemmung abweichendes Verhalten.

Eine Möglichkeit, nicht ideales Hemmverhalten zu identifizieren ist die Bestimmung des sogenannten Hill-Koeffizienten n , der mit Formel 1 bestimmt werden kann.¹⁷⁰

Formel 1: Gleichung zur Berechnung des Hill-Koeffizienten. (v : Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart des Inhibitors I , v_0 : Geschwindigkeit der ungehemmten Reaktion, n : Hill-Koeffizient, I : Inhibitor-Konzentration, K' : scheinbare Dissoziationskonstante)

$$\log \left[\frac{v}{v_0 - v} \right] = -n \times \log[I] + \log K'$$

Die berechneten Werte für die CPP-Furininhibitorkonjugate sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Hemmung des Furins durch CPP-Konjugate. (Mittelwert aus 2 Messugen)

| MI-Nummer | CPP | Sequenz | IC ₅₀ (nM) | <i>n</i> * |
|-------------|-------------|------------------------------------|-----------------------|-------------|
| 1141 | Penetratin | Ac-RQIKIWFQNRRMKWKKRVR-4-Amba | 18,97 | 1,86 ± 0,03 |
| 1142 | Tat | Ac-YGRKKRRQRRRVR-4-Amba | 11,99 | 2,04 ± 0,13 |
| 1143 | Transportan | Ac-AGYLLGKINLKALAALAKKILRVR-4-Amba | 22,76 | 1,51 ± 0,24 |
| 1144 | Poly-Arg | Ac-RRRRRRRVR-4-Amba | 10,66 | 1,69 ± 0,31 |

* *n* ist der Hill-Koeffizient (Formel 1).

Zusätzlich wurden vergleichende Messungen mit dem Inhibitor **MI-0227** durchgeführt, der ein sehr ähnliches Inhibitorsegment besitzt, jedoch nicht mit einer CPP-Sequenz modifiziert ist. Wie zu erwarten, wurde für diesen Inhibitor ein Hill-Koeffizient von 1,01 bestimmt, was einem idealen Hemmverhältnis mit 1:1 Stöchiometrie entspricht.

Abbildung 36 zeigt die Hill-Auftragung für Inhibitor **MI-0227** und Penetratin-Derivat **MI-1141**.

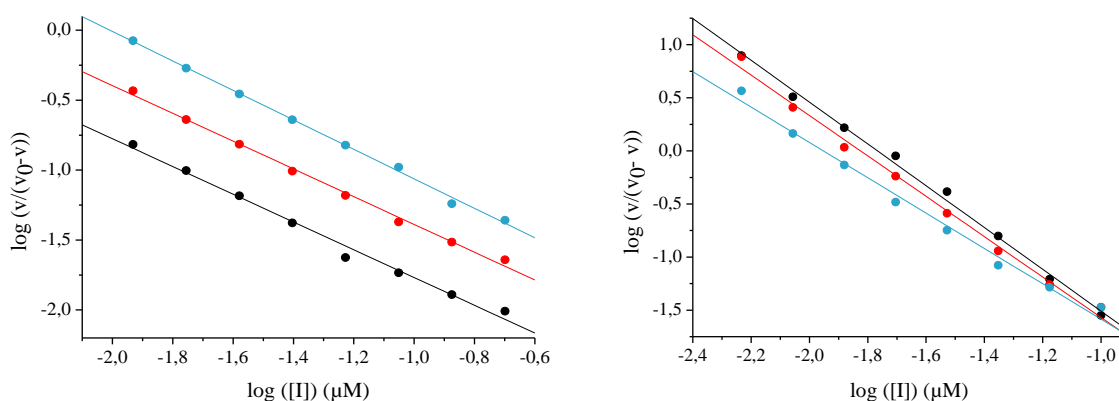


Abbildung 36: Hill-Auftragung für die Hemmung des Furins durch Inhibitor MI-0227 (links) und MI-1141 (rechts) bei Substratkonzentrationen von 5 (●), 20 (●) und 50 µM (●).

Ein Hill-Koeffizient $n = 1$, der im Fall des Hemmstoffs **MI-0227** erhalten wurde, spricht für ein ideales Hemmverhalten. Im Gegensatz dazu wurden für alle CPP-Derivate Hill-Koeffizienten $n > 1$ berechnet. Alle CPP-Derivate zeigen somit ein nicht-ideales Hemmverhalten. Wodurch diese Abweichung hervorgerufen wird, lässt sich anhand des Hill-Koeffizienten nicht bestimmen. Möglicherweise können die Verbindungen auch außerhalb des aktiven Zentrums an das Enzym binden und teilweise eine zusätzliche nicht-kompetitive Hemmung bewirken. Denkbar wären auch verschiedene Bindungsmodi der CPP-Inhibitor-konjugate. Bei unbekannten Hemmmechanismen kann dennoch ein IC₅₀-Werten für diese Inhibitoren bestimmt werden. Abbildung 37 zeigt die Hemmung des Furins durch

Inhibitor **MI-1144** bei einer Konzentration des Substrates **MI-0730** von 12,5 μM und Anpassung der Messwerte an Formel 4 (Abschnitt 5.2.1.2).

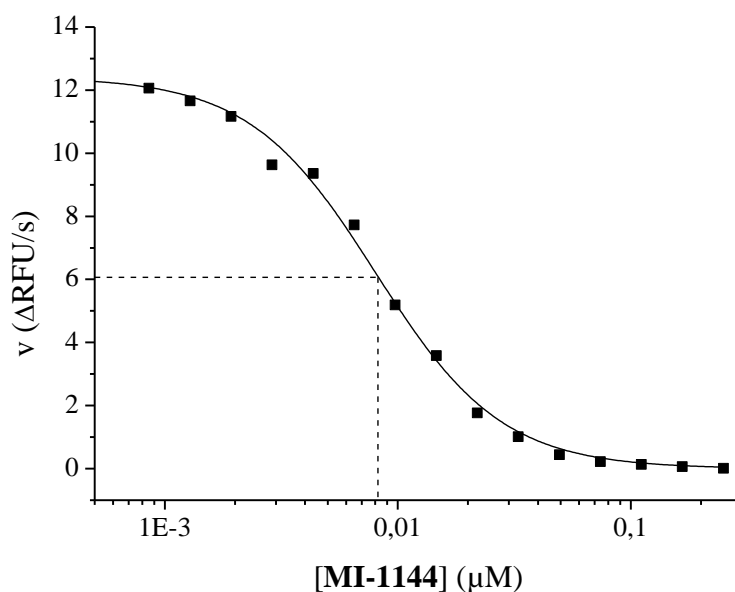


Abbildung 37: Hemmung des Furins durch Inhibitor MI-1144. Die Messung wurde in Gegenwart von 12,5 μM Substrat **MI-0730** durchgeführt. Für die dargestellte Einzelmessung wurde ein IC_{50} -Wert von 8 nM bestimmt.

Die bestimmten IC_{50} -Werte der synthetisierten CPP-Derivate sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die Hemmwerte liegen alle in einem ähnlichen Bereich. Mit einem IC_{50} -Wert von 10,7 nM ist das Poly-Arg-Derivat die wirksamste Verbindung dieser Serie. Die beiden besonders stark polybasischen Verbindungen **MI-1142** und **MI-1144** hemmen Furin etwas stärker als die beiden hydrophoberen Verbindungen **MI-1141** und **MI-1143**, obwohl auch diese Verbindungen mehrere basische Reste im CPP-Segment.

Um die antivirale Wirksamkeit der mit zellpenetrierenden Peptidsequenzen modifizierten Inhibitoren zu untersuchen, wurde die Hemmung der Ausbreitung des FPV in MDCK II-Zellen untersucht. Wie bereits in Abschnitt 1.2.2.1 erwähnt, muss das Hämagglutinin des Influenza-Virus in der Wirtszelle durch Furin und/oder PC5/6 gespalten werden, damit die Viren fusionsfähig werden.⁶² Diese Spaltung findet hauptsächlich im TGN statt, deshalb müssen die Inhibitoren von der Zelle aufgenommen werden und in den Golgi-Apparats gelangen.

Zunächst wurde die Toxizität der synthetisierten Derivate auf die verwendeten MDCK II-Zellen untersucht. Die Zellviabilität wurde nach Inkubation der Zellen über einen Zeitraum von 24 bzw. 48 h bei 37 °C mit Inhibitorkonzentrationen von 25 und 50 μM im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Inhibitor mit dem MTT-Test bestimmt (Abbildung 38).¹⁵⁰ Der

Kontrollwert ohne Inhibitor wurde als 100 % angegeben und die bestimmten Werte in Gegenwart der Inhibitoren auf den Kontrollwert bezogen. Als Referenz diente wiederum der Inhibitor **MI-0227**, der keine CPP-Sequenz besitzt.

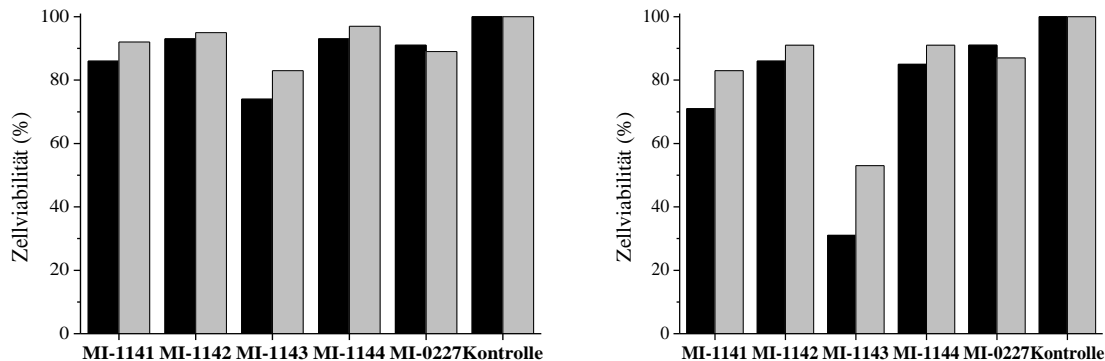


Abbildung 38: Viabilität der MDCK II-Zellen nach 24 h (schwarze Balken) oder 48 h (graue Balken) Inkubation mit 25 µM (links) und 50 µM (rechts) Inhibitor bei 37 °C. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Inhibitor identisch behandelt und das Ergebnis auf 100% skaliert. Die Detektion erfolgte mittels MTT-Assay.

Im Vergleich der Inhibitoren fällt auf, dass besonders das Transportan-Derivat **MI-1143** eine zellschädigende Wirkung hat. Bei einer Konzentration von 50 µM wird nach 24 h die Zellviabilität auf 31 % reduziert. Eine etwas geringere Toxizität wurde für das Penetratin-Konjugat **MI-1141** bestimmt. Im Gegensatz dazu zeigen das Tat-Derivat **MI-1142** sowie die Poly-Arg-Verbindung **MI-1144** kaum zelltoxische Effekte. Diese Ergebnisse decken sich mit bisher publizierten Daten zur Zytotoxizität dieser CPPs. Ihr Einsatz kann zum einen die Schädigung der Zellmembran sowie von Zellorganellen zur Folge haben oder durch die spezifische Interaktion der CPPs mit intrazelluläre Strukturen zu einer Zellschädigung führen.¹⁷¹ Beispielsweise zeigte Transportan ab einer Konzentration von 5 µM in einer BMC-Zelllinie einen toxischen Effekt auf die Zellmembran. Penetratin schädigte in diesem Test die Zellmembran nur in geringem Maße, während Tat keinen Effekt zeigte.¹⁷² Durch die hohe Basizität der Verbindungen ist auch eine Bindung an polyanionische Strukturen im Zytosol und auf Membranen möglich. Penetratin kann zum Beispiel mit Heparin, Polysialinsäuren oder Nukleinsäuren interagieren.^{173; 174} Transportan, welches sich unter anderem von Galanin ableitet, hemmt die Bindung des Galanins an den Galanin Typ1-Rezeptor und die GTPase-Aktivität G_s-gekoppelter Rezeptoren.^{169; 171} CPP-Konjugate mit der Tat-Sequenz können eine ähnliche Wirkung wie der komplette HIV-Transkriptionsfaktor zeigen. Hierzu zählen unter anderem die Hemmung der Angiogenese und das Auslösen der Apoptose.¹⁷⁵ Welche Effekte konkret zur Toxizität der synthetisierten Verbindungen führen, ist bisher noch nicht geklärt.

Anschließend wurde die Hemmung der Ausbreitung des FPV in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen (0,01 – 50 μM) untersucht (Abbildung 39). Als Referenzen wurde der Inhibitor **MI-0227** sowie der noch wirksamere Hemmstoff **MI-0701** verwendet.

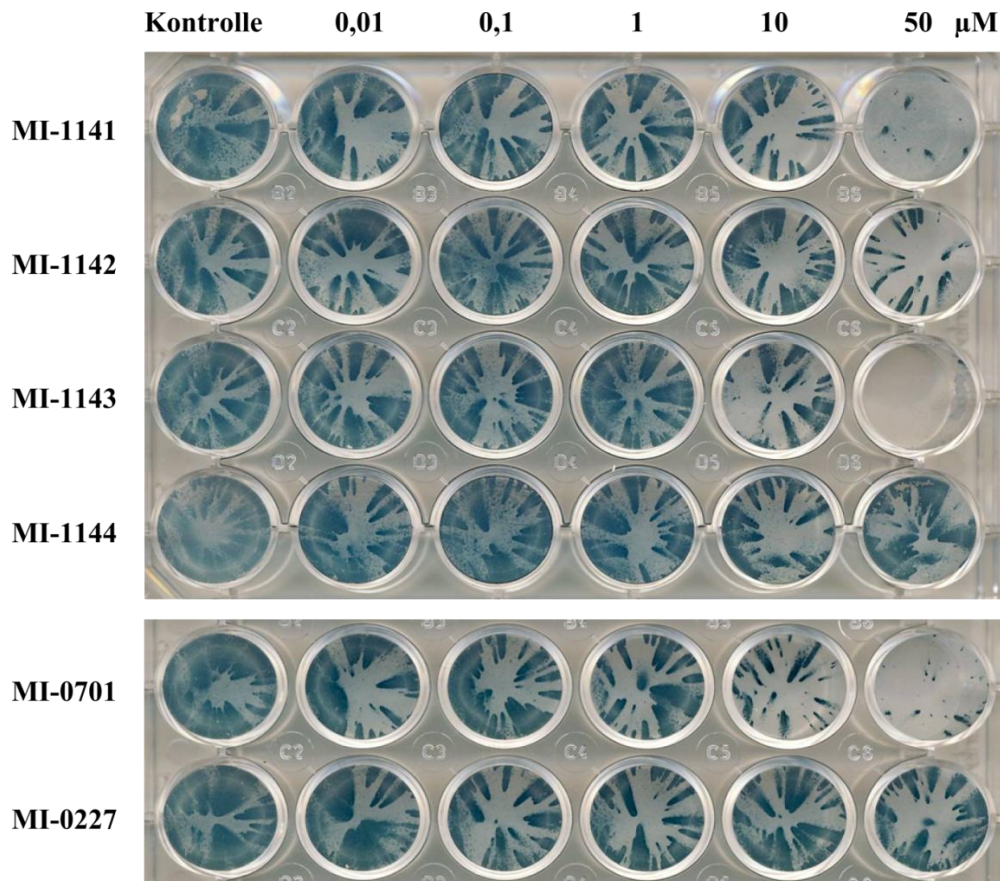


Abbildung 39: Hemmung der Ausbreitung des FPV durch die CPP-Furininhibitorkonjugate. MDCK II-Zellen wurden bei einer MOI von 0,001 mit FPV-Viren infiziert. Eine Stunde später wurden die Zellen gewaschen und mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen (0,01 - 50 μM) versetzt. Nach der Inkubation über 24 h bei 37 °C wurden die infizierten Zellen mit PFA fixiert. Die infizierten Zellen wurden mit Hase-anti-FPV-Antikörpern und HRP-gekoppeltem Esel-anti-Hase-Antikörpern sowie der anschließenden Umsetzung des True Blue Peroxidase Substrats (KPL, Gaithersburg, MD, Vereinigte Staaten) angefärbt.

Die reduzierte Virusausbreitung bei den höheren Konzentrationen (10 und 50 μM) der Derivate **MI-1141** und **MI-1143** ist vermutlich nur auf die zelltoxische Wirkung zurückzuführen, die zu einer Ablösung der Zellen führt (persönliche Information von Dr. Yinghui Lu) und kein spezifischer Hemmeffekt auf Furin. Das Tat-Derivat **MI-1142** zeigte im Vergleich zu **MI-0227** eine sichtbare Hemmung der Virusausbreitung bei einer Konzentration von 50 μM . Es ist möglich, dass es durch die Konjugation mit dem Tat-Motiv zu einer erhöhten Aufnahme in die Zelle kommt und somit der Inhibitor eine bessere Wirkung erzielt als das entsprechende Derivat ohne CPP-Sequenz. Im Vergleich zu Inhibitor **MI-0701**, der

noch bei einer Konzentration von 10 μM eine deutliche Reduzierung der Virusausbreitung zeigt, erwies sich das Tat-Derivat allerdings als weniger wirksam.

3.10. Palmitoylierte Furinhemmstoffe

Ein weiterer Ansatz, um die Fähigkeit der Inhibitoren zu verbessern Zellmembranen zu überwinden, ist dessen Modifizierung mit hydrophoben Acyl-Resten.^{88; 176} Die Acylierung der Furinhemmstoffe mit unterschiedlichen Fettsäureresten in P5-Position wurden bereits früher vorgenommen.¹²⁵ Inhibitoren mit linearen Acylresten einer Fettsäure bis zu zehn Kohlenstoffatomen zeigte einen ähnlichen K_i -Wert wie die Ausgangsverbindung **MI-0227**. Eine weitere Verlängerung des Fettsäurerests führte zu einem schrittweisen Abfall der Furinhemmung. Für die Inhibitoren mit Palmitoyl- und Stearoyl-Rest wurden, wie im Fall der CPP-Derivate, nicht-lineare Kurven in den Dixon-Plots erhalten. Eine Ursache für den abweichenden Hemmmechanismus könnte die Bildung mizellärer oder lammelarer Strukturen in einem Konzentrationsbereich oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) sein, da die Inhibitoren durch die stark polaren Gruppen und den hydrophoben Acylresten einen amphipatischen Charakter besitzen. Untersuchungen zeigten, dass im Fall des Stearylderivats in einem Konzentrationsbereich von 0,2 – 2 μM stabile Mizellen entstehen. Dies liefert allerdings keine klare Erklärung, für die ebenfalls zu geringe Hemmwirkung dieser Verbindungen bei Konzentrationen unterhalb der CMC. Möglicherweise beeinflussen unspezifische Bindungen der Inhibitoren an Furin, Mikrotiterplatten oder Bestandteile des Puffers die verfügbare freie Inhibitorkonzentration, wodurch die Messdaten von der berechneten Abhängigkeit im Dixon-Plot abweichen.

Im Folgenden wurde untersucht, ob durch Einbau eines Spacers zwischen dem Palmitoylrest und dem Inhibitorgrundgerüst, eine Verbesserung der Hemmwirkung erreicht werden kann. Als Spacer wurde das funktionalisierte Ethylenglykolderivat 8-(Amino)-3,6-dioxaoctansäure (Ado) verwendet, das neun Rückgratatomme besitzt. Des Weiteren wurde ein Derivat synthetisiert, bei dem der Palmitoylrest nicht in Position P5, sondern an eine Lysinseitenkette in P3-Position gekuppelt wurde.

Die Auswertung der enzymkinetischen Messungen dieser Verbindungen zeigte, dass die Dixon-Auftragung, ähnlich wie im Fall der CPP-Konjugate (Abbildung 35), eine Krümmung aufwies, was auf ein vom klassischen Hemmmechanismus abweichendes Verhalten hindeutet. Aus diesem Grund wurden für diese Derivate ebenfalls nur IC_{50} -Werte bestimmt (Abbildung 40).

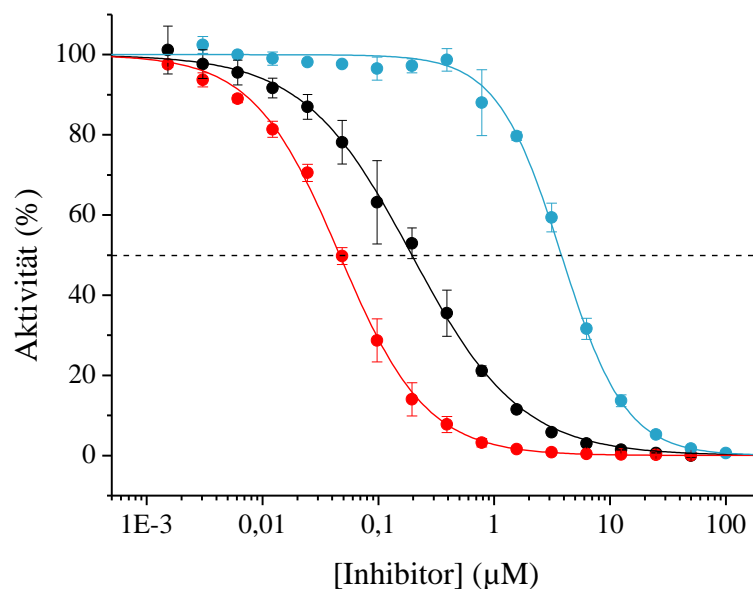
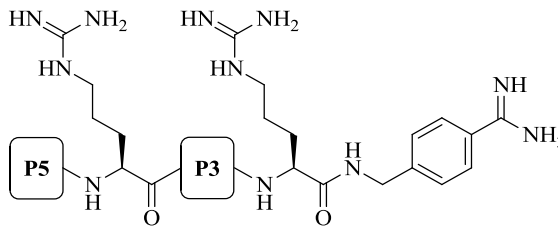
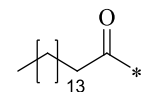
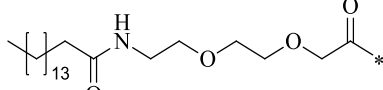
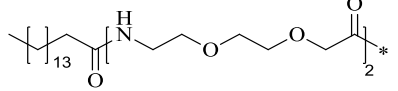
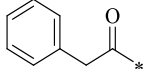


Abbildung 40: Furinhemmung durch die Palmitoyl-Derivate MI-1132 (●), MI-1133 (●) und MI-1145 (●). Alle Messungen wurden bei einer Substratkonzentration von $12,5 \mu\text{M}$ durchgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Geschwindigkeit in die prozentuale Aktivität umgerechnet. Die Anpassung der Messdaten erfolgte an Formel 4 (Abschnitt 5.2.1.2). ($n = 3$)

Den niedrigsten IC_{50} -Wert dieser Serie weist das Di-Ado-Derivat **MI-1133** mit einem Wert von $45,2 \text{ nM}$ auf, jedoch ist diese Hemmwirkung nahezu identisch zum Wert des Inhibitors **MI-0232** ohne Spacer. Überraschenderweise besitzt Verbindung **MI-1132** mit einem Ado-Rest im Linker einen ca. 4-fach höheren IC_{50} -Wert.

Die Kupplung des Palmitoylrests direkt an die Seitenkette des Lysins in P3-Position (**MI-1145**) führte zu einer drastischen Reduktion der Hemmwirkung. Möglicherweise könnte durch die Einführung eines Spacers zwischen der Lysinseitenkette und dem Fettsäurerest die Affinität verbessert werden.

Tabelle 12: Palmitoylierte Furinhemmstoffe. (n = 3)

| MI- Nummer | P5 | P3 | IC ₅₀ -Wert (nM) |
|---------------|---|----------------|-----------------------------|
| |  | | |
| 0232* |  | Val | 50,0 ± 8,5 |
| 1132 |  | Val | 203,5 ± 44,1 |
| 1133 |  | Val | 45,2 ± 4,8 |
| 1145 |  | Lys(Palmitoyl) | 3814,1 ± 180,5 |

* Diese Verbindung wurde zuvor von Dr. Gero Becker synthetisiert.

Im Vergleich zu den wirksamen Furinhemmstoffen, wie den Inhibitoren **MI-0701** oder **MI-1148**, sind alle palmitoylierten Verbindungen relativ schwache Furinhemmstoffe.

3.11. Lokalisationsuntersuchungen eines FITC-markierten Furininhibitors

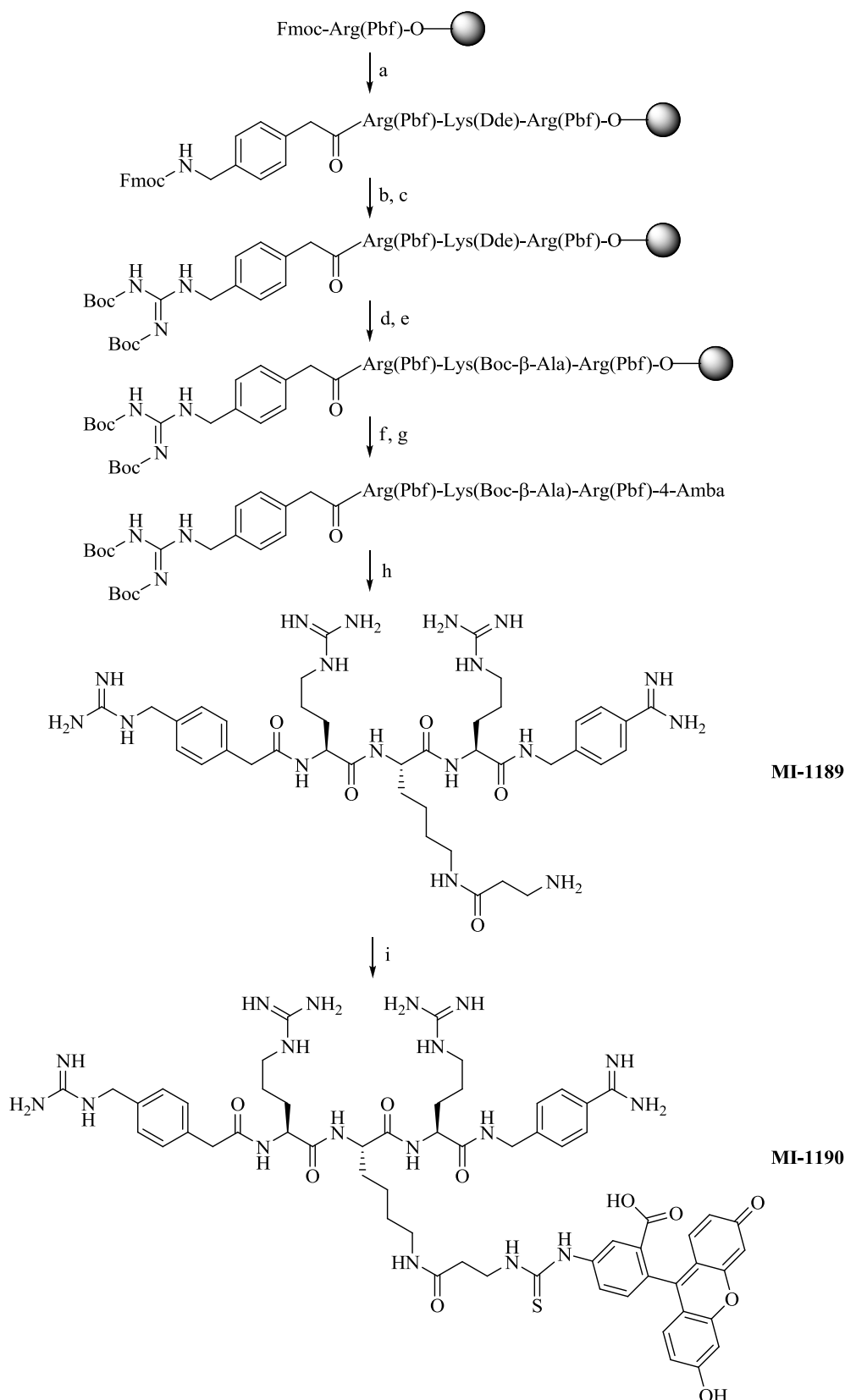
Eine sensitive Methode, um die Verteilung und Lokalisation von Wirkstoffen in der Zelle zu untersuchen, ist ihre radioaktive Markierung, vor allem mit Tritium oder ¹⁴C, da dies die Struktur nicht verändert. Solche Arbeiten sind jedoch mit großem Aufwand bei der Herstellung der radioaktiv markierten Derivate verbunden. Weitere Methoden sind die HPLC-Analyse von Zell- oder Gewebelysaten oder Durchflusszytometrie.^{116; 177} Für erste Voruntersuchungen werden Verbindungen in vielen Fällen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und anschließend die Aufnahme der Derivate in die Zelle mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Generell muss aber berücksichtigt werden, dass die Struktur und Eigenschaften des Inhibitors durch die Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff mehr oder weniger stark verändert werden und somit Rückschlüsse auf

unmarkierte Inhibitoren nur bedingt möglich sind. Fluoreszenzfarbstoffe sind in der Regel sterisch anspruchsvolle Mehrringsysteme, die unter anderem die Hydrophobizität als auch das Molekulargewicht der Verbindung deutlich erhöhen.

Um Aussagen zur Zellaufnahme der Furininhibitoren machen zu können, wurde ein fluoreszenzmarkierter Inhibitor synthetisiert und dessen Aufnahme in Huh-7-Zellen untersucht.

Für die Markierung von Verbindungen stehen unterschiedlichste Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung. Häufig wird das relativ kostengünstige Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) eingesetzt. FITC besitzt eine reaktive Isothiocyanatgruppe, die für die Markierung von Amin- und Thiolgruppen eingesetzt werden kann. Von Nachteil ist, dass FITC im Vergleich zu neueren Fluoreszenzfarbstoffen weniger stabil ist und zum sogenannten Photobleaching neigt.¹⁷⁸ Um die für die inhibitorische Wirkung wichtigen basischen Reste in P1-, P2-, P4- und P5-Position beizubehalten, wurde das FITC über einen β -Alanin-Spacer an die Seitenkette eines Lysins in P3-Position gekuppelt.

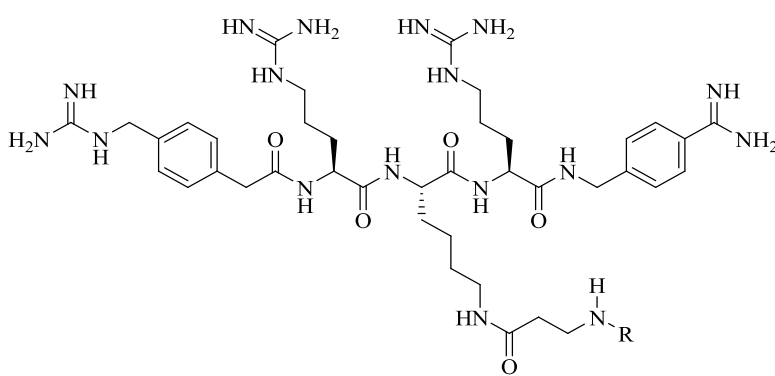
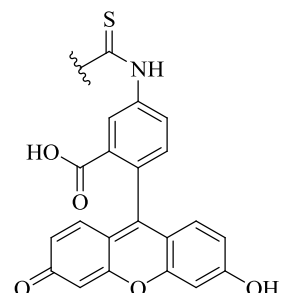
Zunächst wurden an mit Fmoc-Arg(Pbf)-beladenes 2Cl-Trt-Cl-Harz nach der Standardprozedur die Bausteine Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH und Fmoc-4-Aminomethyphenyllessigsäure gekuppelt (Schema 5). Nach Entfernung der Fmoc-Gruppe erfolgte die Umwandlung der terminalen Benzylaminstruktur in ein Guanidin mit N-N'-Bis-Boc-1-Guanylpirazol direkt am Harz. Im Anschluss wurde das Harz dreimal für je 2 Minuten mit 2 % Hydrazin in DMF behandelt um die Dde-Schutzgruppe abzuspalten. An die ungeschützte Seitenkette des Lysins wurde Boc- β -Alanin als Spacer gekuppelt. Anschließend wurde das Peptid unter mild sauren Bedingungen mit 1 % TFA/DCM vom Harz abgespalten und an das geschützte Intermediat (Boc-4-GMe-Phac-Arg(Pbf)-Lys(Boc- β -Ala)-Arg(Pbf)-OH) der 4-Amba-Rest gekuppelt. Es folgte die Abspaltung aller Schutzgruppen und die Reinigung mittels präparativer HPLC. Fluorescein-Isothiocyanat wurde im letzten Schritt in Lösung an die Amingruppe des β -Alanins gekuppelt. Die Verbindung wurde erneut präparativ gereinigt und lyophilisiert. Ab der Kupplung des FITC wurden alle Reaktionen sowie die Aufbewahrung der Verbindungen unter Lichtschutz durchgeführt, da FITC wie bereits erwähnt zu Photobleaching neigt.



Schema 5: Synthese des FITC-markierten Inhibitors MI-1190. Reagenzien und Bedingungen: (a) Fmoc-SPPS an Fmoc-Arg(Pbf)-2Cl-Trt-Cl-Harz, (b) Fmoc-Abspaltung mit 20 % Piperidin/DMF (v/v), 5 + 20 min, (c) 3,0 eq N-N'-Bis-Boc-1-Guanylpurazol, 4,0 eq DIPEA, DMF, RT, über Nacht, (d) Dde-Abspaltung, mit 2 % Hydrazin/DMF (v/v) 3×1 min und 10 % DIPEA/DMF (v/v), (e) 4,0 eq Boc- β -Ala-OH, je 4,0 eq HBTU und HOBt, 8,0 eq DIPEA, DMF, RT, 3 h; (f) 3×1 % TFA/DCM (v/v) für je 30 min, RT, (g) 1,5 eq 4-Amba $\times 2$ HCl, 1,65 eq PyBOP, 4,5 eq 6-Cl-HOBt, 10,5 eq DIPEA, DMF, RT, über Nacht (h) TFA/TIS/ H₂O (95/2,5/2,5; v/v/v), RT, 3 h, Präzipitation im kalten Diethylether, präparative HPLC, (i) 1,8 eq FITC, 9,2 eq DIPEA, 150 μ L DMF, RT, über Nacht; präparative HPLC und Lyophilisierung.

Die Vorstufe **MI-1189** mit dem freien β -Alanin an der Seitenkette des Lysins in P3-Position hemmt Furin mit einem K_i -Wert von 22,15 pM und ist somit nur marginal schwächer wirksam als die Verbindungen **MI-0701** oder **MI-1148**. Die Affinität des FITC-markierten Inhibitors **MI-1190** ist im Vergleich deutlich reduziert, liegt aber mit einem K_i -Wert von 0,50 nM im Bereich der Verbindung **MI-0227**.

Tabelle 13: Struktur des markierten Inhibitors sowie seiner Vorstufe und die bestimmten K_i -Werte. (n = 3)

|  | | |
|--|---|------------------|
| MI-Nummer | R | K_i -Wert (pM) |
| 1189 | H | 22,2 ± 3,4 |
| 1190 |  | 500 ± 30 |

Um zu untersuchen, ob der FITC-markierte Inhibitor in der Lage ist die Spaltung des HA durch Furin zu hemmen, wurden 293T-Zellen mit dem Plasmid pCAGGS-H7 transfiziert und für 12 h in An- und Abwesenheit von **MI-1190** inkubiert. Als Referenzen wurde die Verbindung **MI-1189**, das direkte Analogon des FITC-Derivats **MI-1190** ohne Fluorescein-Markierung sowie die *tight-binding* Inhibitoren **MI-0701** und **MI-1148** verwendet. Die Zelllysate wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und ungespaltenes sowie gespaltenes HA mit Hilfe HA-spezifischer Antikörper im Western-Blot detektiert (Abbildung 41).

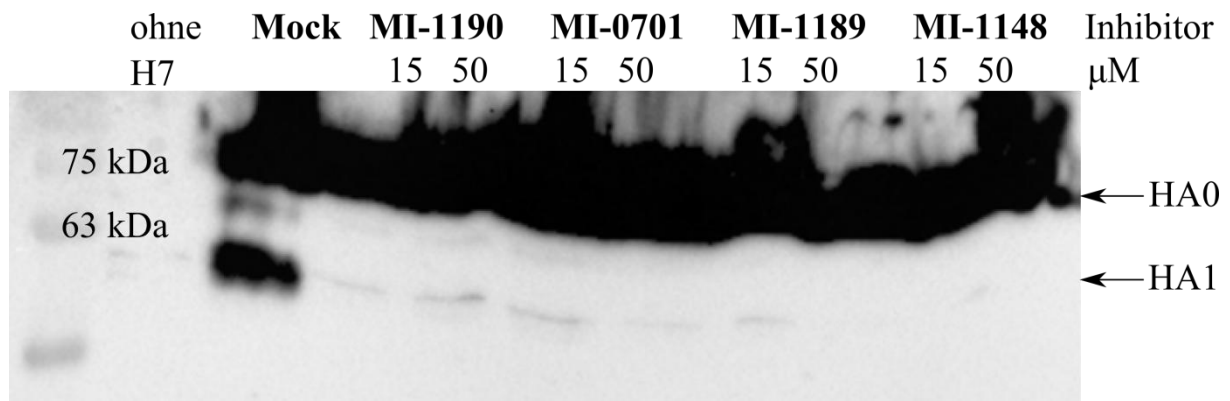


Abbildung 41: Untersuchungen zur furinkatalysierten HA-Spaltung in Anwesenheit des FITC-markierten Inhibitors **MI-1190** sowie der Referenzverbindungen **MI-0701**, **MI-1189** und **MI-1148** (15 und 50 μM im Assay) in 293T-Zellen. Der Nachweis des HA0 und des Spaltungsprodukts HA1 erfolgte mit HA-spezifischem Antiserum im Western-Blot.

Ein erster Western-Blot zeigt, dass die Spaltung des H7-Vorläuferproteins durch alle Inhibitoren bereits bei einer Konzentration von 15 μM vollständig hemmbar ist. In der Spur ohne Inhibitor ist hingegen das HA1-Spaltprodukt deutlich zu erkennen. Die in allen Spuren beobachteten dünnen Banden sind vermutlich unspezifisch, da sich diese Bande auch in der Spur ohne H7 (links) findet. Da die Spaltung des HA0, wie bereits in Kapitel 1.2.2.1 beschrieben, im TGN stattfindet, ist davon auszugehen, dass der Inhibitor in die Zelle aufgenommen wurde. Für die SDS-Page wurde zu viel Probe der jeweiligen Zelllysate aufgetragen, so dass die einzelnen HA0-Banden zum Teil ineinander übergehen, trotzdem ist eine Hemmung der HA0-Spaltung durch alle verwendeten Inhibitoren im Western-Blot deutlich zu erkennen.

In einem weiteren Versuch wurden Huh-7-Zellen mit dem FITC-markierten Inhibitor **MI-1190** (50 μM im Ansatz) über 24 h inkubiert, um die Verteilung des Inhibitors in den Zellen zu untersuchen. Abbildung 39 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellen bei einer 100-fachen Vergrößerung.

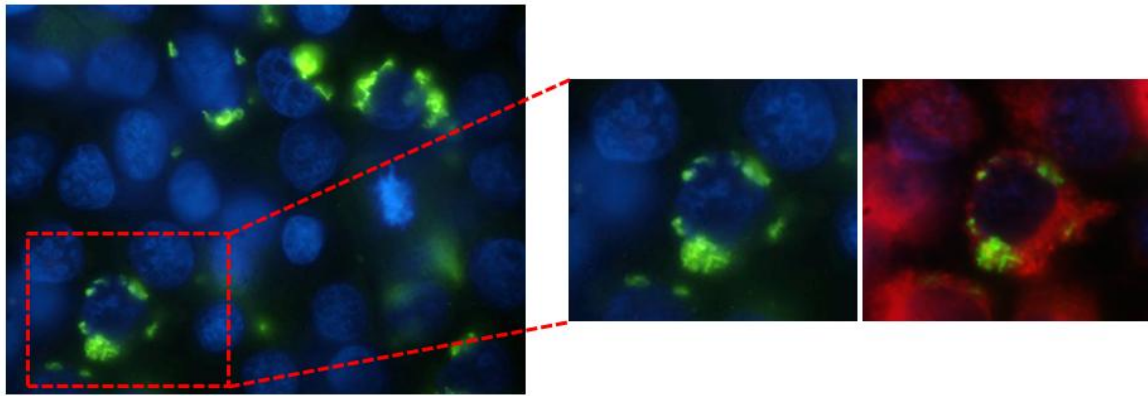


Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Huh-7-Zellen nach Inkubation mit dem Inhibitor MI-1190 (50 μ M) über 24 h. (100-fache Vergrößerung) Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol angefärbt (blau), während der fluoresceinmarkierte Inhibitor eine Grünfärbung besitzt. Das TGN wurde mit Hilfe eines TGN38-spezifischen Primärantikörpers und eines Rhodamin-konjugierten Sekundärantikörpers angefärbt (rot). Die Abbildungen wurden durch Überlagerung (*merge*) der mit unterschiedlichen Filtern erzeugten einzelnen Bilder generiert.

Die DNA der Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt und fluoresziert blau. Der FITC-markierte Inhibitor fluoresziert bei Anregung grün. In der rechten Abbildung ist zusätzlich das TGN über einen TGN38-spezifischen Erstantikörper und einen Rhodamin-konjugierten Zweitantikörper angefärbt und fluoresziert rot. Die Bilder wurden übereinander gelagert, um eine Kolo-kalisation zu zeigen. Die Aufnahmen zeigen größere Aggregate von FITC-markiertem Inhibitor, die unspezifisch auf den Zellen zu liegen scheinen. Bei einigen Zellen ist allerdings zu sehen, dass der Inhibitor um den Zellkern im TGN lokalisiert ist und somit vermutlich in die Zelle aufgenommen wurde. Dies deckt sich mit den Daten des Western-Blots, mit dem eine Hemmung der HA-Spaltung durch den FITC-Inhibitor gezeigt werden konnte. Es ist davon auszugehen, dass zumindest ein Teil der Verbindung von den Zellen aufgenommen wurde. Jedoch ist unklar, warum der Inhibitor nicht in allen Zellen nachweisbar ist.

3.12. Auswahl des geeigneten Substrates für enzymkinetische Studien

In der Literatur finden sich zahlreiche Substrate für enzymkinetische Messungen mit Furin. Am häufigsten werden die AMC-Substrate Boc-RVRR-AMC und pGlu-RTKR-AMC genutzt.¹⁷⁹ 1995 wurde von Anglikar et al. das FRET-Substrat Abz-RVKRGLA-Tyr(NO₂)-D publiziert.¹⁸⁰ Weitere AMC-Substrate wurden von Krysan et al. beschrieben, wobei sich vor allem das Hexapeptid Ac-RARYKR-AMC als besonders geeignetes AMC-Substrat erwiesen hat.¹⁸¹

Zur Auswahl des geeigneten AMC-Substrates wurden die drei im Arbeitskreis zur Verfügung stehenden Verbindungen pGlu-RTKR-AMC (Bachem), Ac-RVRR-AMC und Phac-RVRR-AMC erneut enzymkinetisch charakterisiert. Die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter k_{cat} sowie $\frac{k_{\text{cat}}}{K_m}$ mittels einer AMC-Verdünnungsreihe wurde bereits von Dr. Gero Becker durchgeführt.¹²⁴ Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Bestimmung dieser Parameter die Progresskurvenmethode verwendet. Die so erhaltenen Werte wurden mit den Werten, die über die AMC-Verdünnungsreihe bestimmt wurden, verglichen. Die kinetischen Parameter K_m und V_{max} dieser Substrate wurden unter Verwendung des Standardassays bestimmt und sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Übersicht der getesteten AMC-Substrate und ihre enzymkinetischen Parameter K_m , V_{max} und $\frac{k_{\text{cat}}}{K_m}$.

| MI- Nummer | Substrat | K_m (μM) | V_{max} (RFU/s) | k_{cat} (s^{-1}) | $\frac{k_{\text{cat}}}{K_m}$ ($\frac{\text{L}}{\text{mol} \times \text{s}}$) |
|-------------------|----------|----------------------------|-----------------------------|---|--|
| Ref. ^a | | 2,91 $\pm 0,24$ | 12,55 $\pm 0,29$ | 0,30 ^c 0,29 ^d | 103093 ^c 100702 ± 3254 ^d |
| 0729 ^b | | 8,87 $\pm 0,28$ | 25,12 $\pm 0,31$ | 0,59 ^c 0,64 ^d | 66615 ^c 71842 ± 1842 ^d |
| 0730 | | 5,40 $\pm 0,35$ | 27,73 $\pm 0,56$ | 0,65 ^c 0,56 ^d | 120790 ^c 103509 ± 496 ^d |

^a Das Substrat pGlu-RTKR-AMC (I-1650) wurde kommerziell bei Bachem erworben.

^b Diese Verbindung wurde von Dr. Gero Becker synthetisiert.

^c Die Bestimmung erfolgte mittels AMC-Eichkurve, als Enzymkonzentration wurde 0,95 nM zugrunde gelegt.

^d Die Bestimmung erfolgte mittels Progresskurven-Methode. (n = 3)

Abbildung 43 zeigt die Michaelis-Menten-Auftragung, die zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter V_{max} und K_m verwendet wurde. Das Derivat pGlu-RTKR-AMC hat mit 4,47 μM den niedrigsten K_m -Wert, gefolgt von **MI-0730** ($K_m = 5,40 \mu\text{M}$) und **MI-0729** ($K_m = 8,87 \mu\text{M}$).

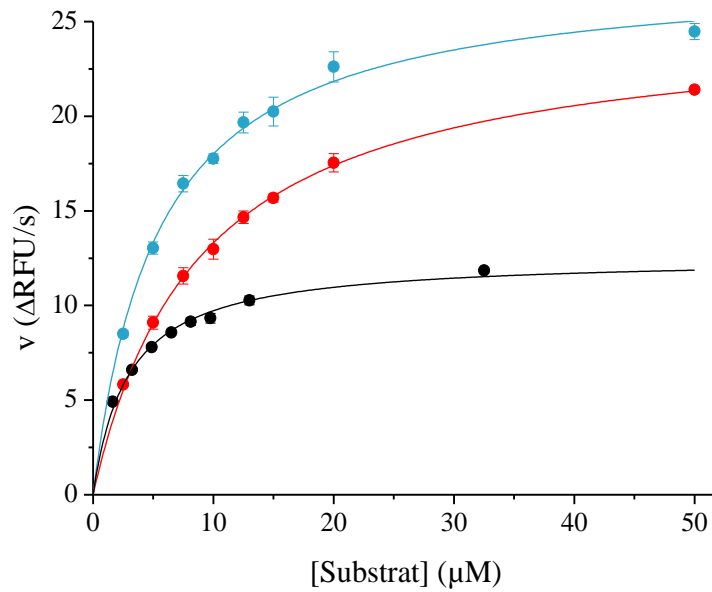


Abbildung 43: v/S-Charakteristiken der Furinsubstrate Pyr-RTKRAMC (●), Ac-RVRR-AMC (●) und Phac-RVRR-AMC (●). (n = 3)

Neben dem K_m -Wert spielt auch der k_{cat} -Wert, der mittels einer AMC-Eichkurve aus V_{max} berechnet werden kann, eine wichtige Rolle bei der enzymkinetischen Charakterisierung von Substraten. Der k_{cat} -Wert, der auch als Wechselzahl bezeichnet wird, gibt die Menge Substrat an, die maximal von dem Enzym in einer bestimmten Zeiteinheit umgesetzt wird. Das Verhältnis $\frac{k_{cat}}{K_m}$ ermöglicht einen direkten Vergleich der Effektivität des Enzyms gegenüber unterschiedlichen Substraten, da hier sowohl der k_{cat} - als auch der K_m -Wert einfließen. Je größer der bestimmte Wert, desto effizienter wird das Substrat von dem Enzym gespalten.

Die Bestimmung des Quotienten $\frac{k_{cat}}{K_m}$ ist auch unter Verwendung der Progresskurven-Methode möglich.^{180; 182} Unter pseudo-erster Ordnung-Bedingungen und bei $[S] \ll K_m$ wird zunächst die apparente 1. Ordnungsgeschwindigkeitskonstante k_{obs} und dann anhand der Formel 2 der Term $\frac{k_{cat}}{K_m}$ bestimmt. Die Messung erfolgte mithilfe des Standardansatzes, allerdings bei einer Substratkonzentration von 0,2 μM und einer Enzymkonzentration von 19 nM im Ansatz.

Formel 2: Gleichung zur Berechnung von k_{cat}/K_m . (k_{obs} : apparente pseudo-erster Ordnungsgeschwindigkeitskonstante, E_0 : Enzymkonzentration, k_{cat} : maximaler Substratumsatz eines Enzyms pro Zeiteinheit, K_m : Michaelis-Menten-Konstante)

$$\frac{k_{obs}}{[E_0]} = \frac{k_{cat}}{K_m} \quad (2)$$

Abbildung 44 zeigt die Progresskurve der Totalhydrolyse des Substrats **MI-0730** und deren Anpassung an eine Reaktion 1. Ordnung.

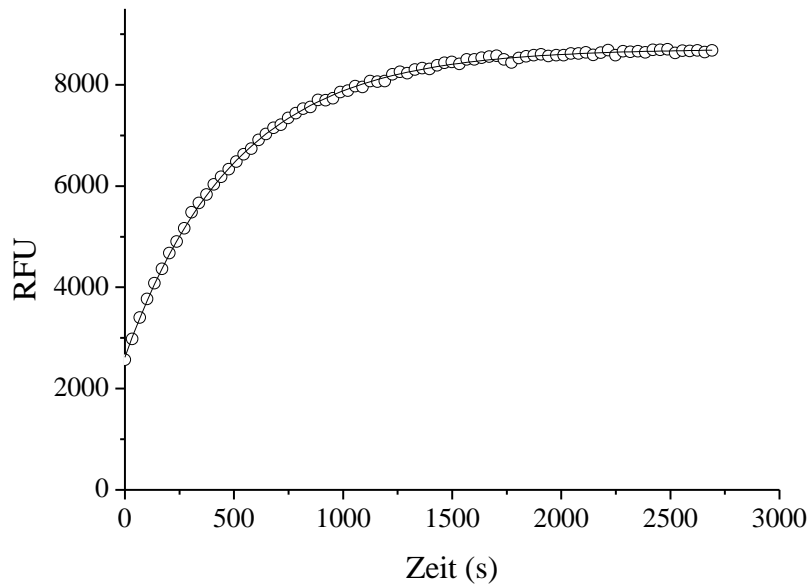


Abbildung 44: Furikatalysierte Hydrolyse des Substrates MI-0730. Die Messdaten der Progresskurve wurden an eine Geschwindigkeitsreaktion pseudo-1. Ordnung angepasst (Substratkonzentration: 0,2 μM , Enzymkonzentration: 19 nM).

Der Vergleich der $\frac{k_{\text{cat}}}{K_m}$ - Werte der unterschiedlichen Substrate zeigt, dass Phac-RVRR-AMC etwas effektiver umgesetzt wird als das kommerziell erhältliche pGlu-RTKR-AMC. Aus diesem Grund wurde für die enzymkinetischen Messungen der K_i -Werte das Substrat Phac-RVRR-AMC verwendet.

4. Zusammenfassung

Die Proproteinkonvertase Furin ist unter anderem durch die Aktivierung vieler bakterieller und viraler Vorläuferproteine in zahlreiche pathogene Prozesse involviert. Aus diesem Grund könnte die Entwicklung von Furininhibitoren ein neuer Ansatz zur Therapie verschiedener Infektionskrankheiten sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden peptidomimetische Furininhibitoren synthetisiert und charakterisiert. Basierend auf der Grundstruktur Phac-Arg-Val-Arg-4-Amba (**MI-0227**) wurden unterschiedliche Modifizierungen vorgenommen, um geeignete Inhibitoren mit verbesserter Hemmwirkung für den Einsatz als antivirale oder antibakterielle Wirkstoffe zu erhalten.

4.1. Derivate der P3-Serie

In einer bereits früher synthetisierten Serie unterschiedlicher Derivate mit proteinogenen Aminosäuren in P3-Position erwiesen sich die Val-Verbindung **MI-0227** und der analoge Ile-Hemmstoff mit K_i -Werten um 0,7 nM als effektivste Furininhibitoren und dienten als Leitstruktur für weitere Modifizierungen.¹²⁶ Interessanterweise zeigte das Leucin-Analogon eine deutlich geringere Furinaffinität. Um den Einfluss des P3-Rests weiter zu untersuchen, wurden unnatürliche, hydrophobe Aminosäuren in dieser Position eingebaut. Dabei wurden große Unterschiede in den Furinhemmwirkungen festgestellt. So führte zum Beispiel der Einbau von α -Aminoisobuttersäure (**MI-1139**) zu einem drastischen Abfall der Hemmwirkung (K_i -Wert: 279 nM). Dagegen konnte eine Verbesserung der Hemmkonstanten mit den *tert*-Leucin und Penicillamin enthaltenden Inhibitoren **MI-1116** und **MI-1182** erzielt werden. Diese beiden Aminosäurereste besitzen ein quartärnär substituiertes C_β -Kohlenstoffatom. Die Kombination des *tert*-Leucins in P3-Position mit meta- oder para-Aminomethylphenylelessigsäure in P5-Position führte zu zweistellig picomolaren Furininhibitoren. Durch die Umwandlung des N-terminalen Amins in ein Guanidin konnte eine weitere Verbesserung der Hemmkonstanten erreicht werden. Die wirksamste Verbindung **MI-1148** hemmt Furin mit einem K_i -Wert von 5,5 pM. Die in dieser Serie synthetisierten Verbindungen gehören somit zu den wirksamsten bisher identifizierten reversiblen Furininhibitoren und wurden in Kooperation mit anderen Arbeitskreisen in Zellkulturversuchen auf ihre Effektivität gegen unterschiedliche virale und bakterielle Pathogene untersucht.

Zunächst wurde der Effekt der Inhibitoren gegenüber den bakteriellen Toxinen von *Bacillus anthracis* und *Corynebacterium diphtheriae* in Zellkulturversuchen geprüft. In Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Bayer wurde die Schutzwirkung ausgewählter Verbindungen gegen Anthraxtoxin in murinen Makrophagen getestet. Die Derivate **MI-0701**, **MI-1150** und **MI-1148** mit basisch-substituiertem P5-Rest zeigten den stärksten Effekt, wobei die Derivate mit dem unsubstituiertem, neutralen Phenylacetyl-Rest **MI-0227** und **MI-1116** deutlich weniger wirksam waren. In diesem Test wurde eine enge Korrelation der bestimmten *in vitro* Hemmkonstanten und der Wirksamkeit in Zellkultur erhalten. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Inhibitoren bei der Bestimmung ihres protektiven Effekts gegen Diphtherietoxin, diese Experimente wurden im Arbeitskreis von Prof. Sandvig durchgeführt. Auch hier zeigten die Derivate **MI-0227** und **MI-1116** bei einer konstanten Inhibitorkonzentration einen deutlich schwächeren Effekt als die Derivate mit zusätzlicher Guanidinogruppe in P5-Position. Für die beiden wirksamsten Verbindungen **MI-0701** und **MI-1148** wurden ein konzentrationsabhängiger Effekt der Schutzwirkung gefunden. Obwohl die Unterschiede gering waren, wurde bei allen drei Konzentrationen eine etwas stärkere Wirksamkeit mit dem neuentwickelten Derivat **MI-1148** bestimmt.

Des Weiteren wurden diese Derivate auf ihre Wirksamkeit gegen Influenza- und Hundestaupeviren untersucht. Im Arbeitskreis von Prof. Garten wurde ihr Einfluss auf die Ausbreitung hochpathogener Influenzaviren der Typen H5N1 und H7N1 geprüft, wobei kein Effekt mit den Derivaten **D9R** und **MI-1116** im Konzentrationsbereich von 0,5 – 50 µM beobachtet wurde. Jedoch wurde eine deutliche Hemmung für den Inhibitor **MI-1136** mit Benzylamingruppe gefunden. Interessanterweise zeigte das analoge meta-Derivat **MI-1149** einen deutlich geringeren Effekt auf die Ausbreitung des FPV, obwohl beide Derivate ähnliche Hemmkonstanten besitzen. Die stärkste Wirksamkeit konnte mit den Guanidionobenzlamin-Derivaten **MI-1150** und **MI-1148** sowie der Referenzverbindung **MI-0701** erzielt werden.

Im Arbeitskreis von Prof. von Messling wurden ausgewählte Verbindungen auf ihren Effekt bezüglich der Vermehrung des Hundestaupevirus untersucht. Die weniger wirksamen Inhibitoren **D9R** und **MI-1116** zeigten nur bei einer Konzentration von 50 µM eine signifikante Reduktion der Virustiter im Überstand und den zellulären Fraktionen, während für die Verbindung **MI-1148** noch bei einer deutlich reduzierten Konzentration von 0,5 µM einen deutlichen Effekt hatte.

Des Weiteren wurde die Hemmung auf die verwandten Enzyme PC1/3 und PC2 getestet. Aufgrund der geringen verfügbaren Enzymmengen wurde nur die Restaktivität in Gegenwart

konstanter Inhibitorkonzentrationen bestimmt. Im Fall der PC1/3 korrespondieren die bestimmten Restaktivitäten mit den K_i -Werten für Furin, auch PC1/3 wird besonders stark durch die Derivate mit basischem P5-Rest gehemmt. Im Gegensatz dazu fiel die Hemmung der PC2 deutlich schwächer aus.

In der Arbeitsgruppe von PD Dr. Manuel Than konnte eine Kristallstruktur des humanen Furins im Komplex mit dem Inhibitor **MI-1148** gelöst werden. Das 4-Amidinobenzylamid in der P1-Position bildet in der S1-Tasche zahlreiche Wechselwirkungen zu den Aminosäuren Pro256, Asp306, Ala292 und Asp258 aus. Diese Tasche wird am Boden durch ein pentagonal-bipyramidal komplexiertes Ca^{2+} -Ion stabilisiert. Die Seitenkette des Arginins in Position P2 bindet an Asp154, Asn192 und über ein verbrückendes Wassermolekül an Asp228. Zwischen dem *backbone*-Carbonyl und dem -NH des P3-tert-Leucins werden zwei antiparallele H-Brücken zum Furinrest Gly255 ausgebildet. Die raumausfüllende Seitenkette des Tle stabilisiert sehr wahrscheinlich durch zahlreiche Van-der-Waals-Wechselwirkungen die Inhibitor-konformation und trägt somit zur verstärkten Hemmwirkung bei. In Position P4 bindet die Guanidinofunktion in der Seitenkette des Arginins in eine flache Tasche an die Aminosäuren Glu236, Asp264 und Tyr308. In Position P5 interagiert die 4-Guanidinomethylphenylacetyl-Gruppe über mehrere Wechselwirkungen mit Val231 und Glu236 sowie zwei verbrückenden Wassermolekülen. Die gesamte Struktur wird durch zahlreiche Wechselwirkungen teils weiter verbrückender Wassermoleküle zusätzlich stabilisiert.

4.2. Einbau von Tranexamsäure als P5-Rest

Neben der 4-Amino- oder Guanidinomethylphenyllessigsäure wurde Tranexamsäure (*trans*-4-(Aminomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure) in P5-Position eingebaut. Das Amin-Derivat und das daraus hergestellte Guanidin-Analogon hemmen Furin mit K_i -Werten zwischen 50 – 100 pM, sind aber weniger wirksam als die Derivate mit einem basisch-substituiertem aromatischen Phenylacetylrest in P5-Position.

4.3. Derivate mit N-terminalem D-Arg-Resten

In dieser Serie wurde das P4-P1-Segment Arg-Val-Arg-4-Amba N-terminal mit Argininresten in L- als auch in D-Konfiguration modifiziert. Diese Derivate hemmen Furin im subnanomolaren Bereich, wobei eine korrekte Anpassung an die Gleichung für eine reversible

Hemmung durch *tight-binding* Inhibitoren nicht möglich war. Ein exakter Grund für die Abweichung der Messdaten von der berechneten Anpassung konnte nicht ermittelt werden. Die vollständig L-konfigurierte Referenzverbindung **MI-1158** (H-Arg-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba) und das D-Arg-Derivate **MI-1184** (H-dArg-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba) zeigten mit K_i -Werten um 30 pM die stärkste Hemmung dieser Serie. Des Weiteren wurden die Verbindungen auf ihren Effekt auf die Ausbreitung hochpathogener Influenzaviren des Subtyps H7N1 geprüft. In diesem Test zeigten die Derivate mit einem N-terminalen D-Arginin eine leichte Hemmung der Virusausbreitung bei einer Konzentration von 50 μ M. Die Verbindung **MI-1158** zeigte trotz des wirksamen K_i -Wertes keinen Effekt, denkbar wäre ihr rascher Abbau durch Aminopeptidasen.

4.4. Verkürzte und verlängerte Derivate

Die starke Affinität der Inhibitoren eröffnet die Möglichkeit, diese Strukturen weiter zu vereinfachen. Die Pentapeptidmimetika besitzen ein verhältnismäßig hohes Molekulargewicht, aus diesem Grund wurde bei den verkürzten Derivaten auf den P5-Rest verzichtet. Der Austausch des P4-Arginins durch 3- oder 4- Amino- bzw. Guanidinomethylphenylelessigsäure führte zu einem deutlichen Affinitätsverlust. Dagegen zeigten Derivat **MI-1146** (Gua-Ava-Val-Arg-4-Amba) und das Tle-Analogon **MI-1152** mit einem 5-Guanidinovaleriansäurerest eine deutlich bessere Furinhemmung mit K_i -Werten zwischen 1 – 2 nM. Diese Inhibitoren wurden auf ihre Schutzwirkung gegen Anthraxtoxin untersucht. Beide Verbindungen zeigten einen konzentrationsabhängigen Schutz vor Anthraxtoxin, wenn auch nur in höheren Konzentrationen von ca. 10 – 100 μ M.

Des Weiteren wurde versucht die Affinität der Leitstruktur zu verbessern, indem weitere L-Argininreste in den Positionen P5 und/oder P6 eingebaut wurden, da zahlreiche Furinsubstrate mit basischem P5- und P6-Rest bekannt sind. Das Derivat **MI-1103** mit drei Argininresten in den Positionen P4 – P6 ist mit einem K_i -Wert von 13,8 pM im Rahmen dieser Serie am wirksamsten. Die anderen Inhibitoren hemmen Furin mit Hemmkonstanten um 50 pM etwas weniger stark. Diese Derivate wurden auch für Kristallisationsstudien mit Furin eingesetzt, jedoch konnte keine Elektronendichte N-terminal des P4-Rests gefunden werden.

4.5. Einbau des Glutaminsäurerests in P3-Position

Bei früheren Wirkstoffentwicklungen wurde beobachtet, dass einige stark basische Verbindungen den hERG-Kanal am Herzen blockieren, wodurch lebensgefährlichen *Torsade des pointes*-Tachykardien ausgelöst werden können.¹⁵⁷ Die hERG-Bindung konnte in vielen Fällen durch den Einbau einer Säurefunktion signifikant reduziert werden. Der aus diesem Grund bereits früher synthetisierte Inhibitor Phac-Arg-Glu-Arg-4-Amba besitzt einen K_i -Werte von 105 nM und ist ca. 125-fach weniger wirksam als das Val-Analogon. Anstelle des neutralen Phac-Rests wurde deshalb in P5-Position ein basischer Rest eingebaut und untersucht, ob die reduzierte Hemmwirkung aufgrund des Einbaus der Glutaminsäure in P3-Position teilweise kompensiert werden kann. Das 4-Aminomethylphenylacetyl-Derivat **MI-1183** ist mit einem K_i -Wert von 2,68 nM weniger stark wirksam als das guanylierte Analogon **MI-1188** mit einer Hemmkonstante von 0,58 nM. Beide Verbindungen sind deutlich stärkere Furinhemmstoffe als das Phac-Analogon.

4.6. Furinhemmstoffe mit Agmatin- und Noragmatinrest in P1-Position

In einigen Arbeiten wurde ein 4-Amidinobenzylamidrest als Ursache unterschiedlicher Nebenwirkungen angesehen.¹¹⁶ Die außergewöhnlich starke Hemmwirkung der Verbindung **MI-1148** gestattet den Austausch des 4-Amba-Rests durch die linearen Guanidinderivate Agmatin oder Noragmatin in P1-Position. Der Einbau dieser P1-Reste führte im Fall der Furininhibitoren bei der Leitstruktur Phac-Arg-Val-Arg-P1 zu 100-fach schlechteren Hemmkonstanten.¹³⁵ Um die Affinität der Verbindungen wieder zu verbessern, wurden Agmatin oder Noragmatin mit Tle und 3- bzw. 4-Guanidinomethylphenylacetyl-Gruppen in P3- und P5-Position kombiniert. Die 4-Guanidinomethylphenylacetyl-Derivate **MI-0090** und **MI-0092** hemmen Furin mit K_i -Werten zwischen 0,2 – 0,3 nM etwa um den Faktor 2 stärker als die analogen meta-substituierten Verbindungen. Die Zytotoxizität der Inhibitoren wurde in MDCK II-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass die Derivate keinen zytotoxischen Effekt besitzen. Zusätzlich wurde die Wirksamkeit der Verbindungen auf die Ausbreitung von FPV in MDCK II-Zellen untersucht. Jedoch zeigte keine der Verbindungen eine Hemmwirkung auf die Ausbreitung des FPV in Zellkultur.

4.7. Modifizierung der Furinhemmstoffe mit zellpenetrierenden Peptiden

Die Verbesserung der Zellpermeabilität der synthetisierten Inhibitoren war ein Ziel dieser Arbeit. Eine Möglichkeit, um die Aufnahme peptidischer Verbindungen in die Zelle zu verbessern, ist deren Kupplung mit zellpenetrierenden Peptidsegmenten. Für diese Serie wurden die CPP-Sequenzen Tat, Penetratin, Transportan und Poly-Arg ohne Linker direkt an die freie P4-Position des Inhibitors Arg-Val-Arg-4-Amba gekuppelt. In enzymkinetischen Assays zeigten diese Derivate exponentielle Kurven in der Dixon-Auftragung und somit ein von der klassischen kompetitiven Hemmung mit 1:1 Stöchiometrie abweichendes Verhalten. Aus diesem Grund erfolgte nur die Bestimmung ihrer IC_{50} -Werten, die alle im Bereich von etwa 10 – 20 nM liegen. In Zellkulturversuchen wurde die Toxizität dieser Derivate auf die verwendeten MDCK II-Zellen geprüft. Das Penetratin-Derivat **MI-1141** und das Transportan-Konjugat **MI-1143** zeigten eine zellschädigende Wirkung, während die Inkubation mit der Tat-Verbindung **MI-1142** sowie dem Poly-Arg-Inhibitor **MI-1144** kaum zelltoxische Effekte bewirkte. Weiterhin wurde die Hemmung der Ausbreitung des FPV in Gegenwart dieser Inhibitoren untersucht. Einzig das Tat-Konjugat **MI-1142** zeigte im Vergleich zu **MI-0227** ohne CPP-Segment eine sichtbare Hemmung der Virusausbreitung bei einer Konzentration von 50 μ M. Dies könnte auf eine erhöhte Aufnahme dieser Verbindung in die Zelle zurückzuführen sein.

4.8. Palmitoylierte Furinhemmstoffe

Die Zellpermeabilität von Verbindungen sollte auch durch die Modifizierung mit hydrophoben Resten verbessert werden können. In einer Inhibitorserie mit unterschiedlichen Fettsäuremodifizierungen in P5-Position zeigte der Inhibitor Palmitoyl-Arg-Val-Arg-4-Amba exponentielle Kurven im Dixon-Plot und eine reduzierte Hemmwirkung, die möglicherweise auf die Bildung von Mizellen zurückzuführen ist.¹²⁵ Deshalb wurde untersucht, ob die Einführung eines Spacers zwischen dem Fettsäurerest und dem Inhibitor die Hemmwirkung verbessert und den Hemmmechanismus verändert. Das Derivat **MI-1133** mit dem Spacer aus 2 Ado-Resten (18 *backbone*-Atome) besitzt einen IC_{50} -Wert von 45,19 nM, der im selben Bereich des Derivats **MI-0232** ohne Spacer liegt. Die Verbindung mit einem Ado-Rest (**MI-1132**) im Linker ist interessanterweise mit einem IC_{50} -Wert von 204 nM deutlich schwächer wirksam. Des Weiteren wurde der Palmitoylrest ohne Spacer direkt an eine Lysinseitenkette in P3-Position (**MI-1145**) gekuppelt, die erhaltene Verbindung ist jedoch kaum wirksam.

4.9. Lokalisationsuntersuchungen eines FITC-markierten Furininhibitors

Um die zelluläre Aufnahme und Lokalisation peptidischer Verbindungen untersuchen zu können, wurde der FITC-markierte Inhibitor **MI-1190** (4-GMe-Phac-Arg-Lys(β -Ala-FITC)-Arg-4-Amba) synthetisiert. Diese Verbindung hemmt Furin mit einem K_i -Wert von 0,5 nM im Bereich des Hemmstoffs **MI-0227**. Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation wurden Huh-7-Zellen mit dem FITC-markierten Inhibitor (50 μ M im Ansatz) über 24 h inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten größere Aggregate des FITC-markierten Inhibitors, die unspezifisch auf den Zellen zu liegen schienen. Einige Zellen zeigten allerdings auch eine Kolokalisation des Inhibitors mit dem TGN, was auf eine zumindest teilweise zelluläre Aufnahme hindeutet.

4.10. Enzymkinetische Charakterisierung der Substrate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die enzymkinetischen Parameter V_{\max} und K_m von drei AMC-Substraten bestimmt. Die Konstanten K_m und V_{\max} wurden mit dem Standardassay bestimmt, während der Term $\frac{k_{\text{cat}}}{K_m}$ sowohl mittels AMC-Eichkurve als auch anhand der Progresskurvenmethode ermittelt wurde. Trotz geringer Abweichungen konnten mit beiden Methoden ähnliche $\frac{k_{\text{cat}}}{K_m}$ – Werte bestimmt werden. Das Derivat **MI-0730**, Phac-RVRR-AMC zeigte unter den gewählten Bedingungen einen etwas effektiveren Umsatz als das acetylierte Analogon **MI-0729** und die kommerziell erhältliche Referenzverbindung Pyr-RTKR-AMC. Das Substrat **MI-0730** wurde mittels einer Kombination aus Festphasenpeptid- und Lösungssynthese hergestellt und für die Bestimmung sämtlicher Inhibitorkonstanten verwendet.

5. Experimenteller Teil

5.1. Material und Methoden

5.1.1. Verwendete Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel stammen von den Firmen Acros (Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland), Fluka (Teil von Sigma-Aldrich), Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland), VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) und Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland). Lösungsmittel wurden durch Lagerung über geeignetem Molsieb getrocknet. Aminosäuren und deren Derivate sowie die Kupplungsreagenzien wurden von den Firmen Bachem Holding AG (Bubendorf, Schweiz), Novabiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Iris Biotech GmbH (Markredwitz, Deutschland), ORPEGEN Peptide Chemicals GmbH (Heidelberg, Deutschland) oder PolyPeptide Laboratories (Strasbourg, Frankreich) bezogen. Für die analytische und präparative HPLC wurde Acetonitril der Firma VWR (HiPerSolv CHROMANORM) und Reinstwasser verwendet. Das Reinstwasser wurde mit einer NOWA pure select Anlage (KSN Wassertechnik, Nistertal, Deutschland) hergestellt. Die verwendete Trifluoressigsäure stammt aus einer Hochschullieferung der Firma Solvay GmbH (Hannover, Deutschland). Wässrige Lösungen von Säuren, Basen, Salzen oder Puffer wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt.

5.1.2. Peptidsynthese

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese erfolgte nach einem Fmoc-Protokoll (Abschnitt 5.3.1, Methode A) mit einem Syro 2000 (MultiSynTech GmbH, Witten, Deutschland) in 2 mL Polypropylen-Spritzen mit Polyethylen-Fritten (MultiSynTech). Die manuelle Festphasenpeptidsynthese wurde nach einem ähnlichen Protokoll (Abschnitt 5.3.1, Methode A) entweder in einem Schüttler (Ika, Staufen, Deutschland) in 2 bzw. 5 mL Polypropylen-Spritzen (MultiSynTech) oder mit einem Drehschüttler in Reaktionsgefäßen aus Glas mit eingeschmolzener Sinterfritte durchgeführt.

5.1.3. HPLC

5.1.3.1. Analytische HPLC

Die analytischen Chromatogramme wurden mit einer Shimadzu LC-10A-Anlage (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland), bestehend aus einem SCL-10AVP System Controller, einem SIL-10AXL Auto Injector, einem SPD-M10AVP Diodenarray-Detektor, zwei LC-10ATVP Pumpen und einem CTO-10A Säulenofen mit einer C18-Säule (Nucleodur, 5 μm , 100 \AA , 4.6 \times 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland), aufgenommen. Als mobile Phase wurde ein H₂O/ACN-Gradient mit 0,1 % TFA (pH \approx 2) gewählt. Folgende Parameter wurden verwendet:

Tabelle 15: Parameter der analytischen HPLC.

| | |
|---------------|-----------------------------|
| Flussrate | 1 mL/min |
| Fließmittel A | 0,1 % TFA in Reinstwasser |
| Fließmittel B | 0,1 % TFA in Acetonitril |
| Gradient | linear mit 1 % B pro Minute |

Je nach Verbindungen wurden unterschiedliche Startkonzentrationen des Laufmittels B gewählt. Die Detektion erfolgte bei $\lambda = 220 \text{ nm}$.

5.1.3.2. Präparative HPLC

Die Reinigung der Verbindungen erfolgte mit einer präparativen HPLC-Anlage der Firma Varian (Pumpen: Prep Star Modell 218 Gradienten System, Detektor: Pro Star Modell 320, Fraktionskollektor: Varian Modell 701) mit einer C8-Säule (Nucleodur, 5 μm , 100 \AA , 32 \times 250 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Als mobile Phase wurde ebenfalls ein H₂O/ACN-Gradient mit 0,1 % TFA (pH \approx 2) gewählt.

Tabelle 16: Parameter der präparativen HPLC.

| | |
|---------------|-------------------------------|
| Flussrate | 20 mL/min |
| Fließmittel A | 0,1 % TFA in Reinstwasser |
| Fließmittel B | 0,1 % TFA in Acetonitril |
| Gradient | linear mit 0,5 % B pro Minute |

Die Startkonzentration des Laufmittels B richtete sich nach der Retentionszeit des Produkts. Die Reinheit der Peptide betrug $\geq 95\%$.

5.1.4. Lyophilisierung

Die synthetisierten und gereinigten Verbindungen wurden entweder aus 80 % *tert*-Butanol in demineralisiertem Wasser oder reinem demineralisiertem Wasser an einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) lyophilisiert und als TFA-Salze erhalten.

5.1.5. Massenspektrometrie

Die molekulare Masse der synthetisierten Derivate wurde mit einem QTrap 2000 ESI Massenspektrometer (früher Applied Biosystems, jetzt life Technologies, Darmstadt, Deutschland) oder einem AutoSpec (früher Micromass, jetzt Waters Corporation, Eschborn, Deutschland) im ESI (+)-Modus bestimmt.

5.1.6. NMR-Spektroskopie

Die ^1H - und ^{13}C -Spektren wurden an einem JEOL ECA-500 (JEOL USA, Inc., Peabody, Massachusetts (MA), Vereinigte Staaten) aufgenommen. Die Kalibrierung erfolgte anhand interner Lösungsmittelsignale und die chemische Verschiebung wurde in ppm angegeben.¹⁸³ Die Auswertung der aufgenommenen Spektren erfolgte mit der Software ACD/NMR Processor Academic Version 12.01 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Kanada). Verwendete Abkürzungen zur Multiplizität: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, m = Multiplett, br. = breit.

5.1.7. Elementaranalyse

Die Elementaranalyse ausgewählter Verbindungen wurde an einem Elementar vario MICRO (Elementaranalysensysteme GmbH, Hanau, Deutschland) durchgeführt.

5.2. Enzymkinetische Messungen

Die Stammlösungen der Inhibitoren wurden mit einer Konzentration von 10 mM in DMSO hergestellt und bei -20 °C aufbewahrt. Für die Berechnung der Molekulargewichte wurde pro basische Gruppe ein Molekül TFA berechnet.

5.2.1. Messungen mit Furin

5.2.1.1. Bestimmung der IC₅₀-Werte

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte für nicht klassische Inhibitoren analog der Standardbestimmung mit dem Unterschied, dass bei einer Substratkonzentration von 12,5 µM 16 Messwerte aufgenommen wurden, um eine optimale Anpassung der bestimmten *steady state*-Geschwindigkeiten an Formel 4 zu erhalten.¹⁴⁶

Formel 4: Gleichung zur Bestimmung eines IC₅₀-Wertes. (v: Geschwindigkeit der Enzymreaktion, v₀: Geschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion, I: Inhibitorkonzentration, IC₅₀: mittlere inhibitorische Konzentration, p: Steilheit der Kurve)

$$v = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{I}{IC_{50}}\right)^p}$$

5.2.1.2. Hemmung durch klassische, reversible und kompetitive Inhibitoren

Die K_i-Werte der synthetisierten Inhibitoren wurden bei RT in schwarzen FluoroNunc F96 MaxiSorp Platten (Nunc, Langenselbold, Deutschland) mit einem Fluoreszenz-Plattenleser Tecan Safire² (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei λ_{ex} = 380 nm und λ_{em} = 460 nm bestimmt. Der Messansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 160 µL Puffer (100 mM HEPES, 0,2 % Triton X-100, 2 mM CaCl₂, 0,02 % Natriumazid und 1 mg/mL BSA, pH 7,0)
- 20 µL Substratlösung Phac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC (in H₂O, Konzentrationen im Assay: 5, 20 und 50 µM)
- 2 µL Inhibitor (in DMSO)
- 20 µL Enzymlösung in Messpuffer (0,95 nM im Messansatz).

Durch die Zugabe des Enzyms wurde die Reaktion gestartet. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 20 Minuten. Bei jeder Bestimmung der Hemmkonstanten wurde zusätzlich die Aktivität des Furins in Abwesenheit eines Inhibitors bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen und die kinetischen Parameter K_m und V_{max} bestimmt. Die InhibitorKonzentration wurde im Messansatz um mehr als eine Größenordnung variiert. Die durch lineare Regression der Progresskurven ermittelte Geschwindigkeit v wurden an die Gleichung für kompetitive Hemmung (Formel 3) für alle drei Substratkonzentrationen angepasst.

Formel 3: Gleichung für eine reversible und kompetitive Enzymhemmung. (v : Geschwindigkeit der Enzymreaktion, V_{max} : Maximalgeschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion, S : Substratkonzentration, K_m : Michaelis-Menten-Konstante, I : InhibitorKonzentration, K_i : Inhibitionskonstante)

$$v = \frac{V_{max} \times S}{K_m \times \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S}$$

5.2.1.3. Bestimmung der Hemmung durch *tight-binding* Inhibitoren

Inhibitoren, deren K_i -Wert im Bereich der verwendeten Enzymkonzentration lag, wurden unter *tight-binding* Bedingungen vermessen.^{145; 184} Es wurde der gleiche Messansatz wie für die Standardbestimmung verwendet, jedoch wurde nur eine Substratkonzentration von 12,5 μM eingesetzt. Aus den Progresskurven wurde mittels linearer Regression die Geschwindigkeit v ermittelt und anhand von Formel 5 der apparente K_i^* -Wert berechnet.

Formel 5: Gleichung für eine reversible Hemmung durch *tight-binding* Inhibitoren. (v : Geschwindigkeit der Enzymreaktion, v_0 : Geschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion, K_i^* : apparente Hemmkonstante, I_t : totale InhibitorKonzentration, E_t : totale Enzymkonzentration im Messansatz)

$$v = v_0 \times \frac{[(K_i^* + I_t - E_t)^2 + 4 \times K_i^* \times E_t]^{1/2} - (K_i^* + I_t - E_t)}{2 \times E_t}$$

Zur Berechnung der K_i -Werte wurde K_i^* durch den Substratschutzterm dividiert (Formel 6).¹⁸⁴

Formel 6: Formel zur Korrektur des apparenten K_i^* durch den Substratschutzterm. (K_i : Inhibitionskonstante, K_i^* : apparente Hemmkonstante, S : Substratkonzentration, K_m : Michaelis-Menten-Konstante)

$$K_i = \frac{K_i^*}{1 + \frac{S}{K_m}}$$

5.2.2. Kinetische Messungen mit mPC1/3 und mPC2

Aufgrund der begrenzten Enzymmenge wurden für diese Proproteinase keine K_i -Werte der synthetisierten Verbindungen bestimmt. Stattdessen wurde nur die Restaktivität ausgewählter Inhibitorkonzentrationen (0,10 und 1,00 μM im Assay) ermittelt. Die Messungen wurden in opaken 96-well Costar Corning 3365 Platten (Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland) bei RT durchgeführt. Die Enzyme wurden von Prof. Iris Lindberg (University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, Vereinigte Staaten) zur Verfügung gestellt. Genaue Angaben zu den Konzentrationen der PC1/3- und PC2-Lösung waren nicht verfügbar. Laut persönlicher Information von Iris Lindberg liegt die Enzymkonzentration der beiden Enzymstammlösungen zwischen 0,10 – 0,40 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, demnach war die Konzentration im Assay etwa 0,005 – 0,020 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$.

Tabelle 17: Messansatz zur Bestimmung der Restaktivität von PC1/3 und PC2 in Anwesenheit ausgewählter Inhibitoren.

| PC1/3 | PC2 |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> 35 μL Enzymlösung¹⁸⁵ (2,5 μL Stammlösung + 32,5 μL Puffer (100 mM Natriumacetat, 5 mM CaCl_2, 0,1 % Brij 35, 0,1 % Natriumazid und 0,01 % BSA, pH 5,5)) | <ul style="list-style-type: none"> 35 μL Enzymlösung¹⁸⁶ (2,5 μL Stammlösung + 32,5 μL Puffer (100 mM Natriumacetat, 2 mM CaCl_2, 0,1 % Brij 35, 0,1 % Natriumazid und 0,01 % BSA, pH 5,0)) |
| <ul style="list-style-type: none"> 5 μL Inhibitorlösung (Verdünnungen in dem jeweiligen oben genannten Enzympuffer) und Inkubation der Platte für 20 Minuten bei RT. 10 μL des Substrates pGlu-RTKR-AMC (Bachem, gelöst in Wasser, Konzentration im Messansatz 200 μM) | |

Das Gesamtvolumen des Messansatzes betrug somit 50 μL . Die Substratspaltung wurde über 30 Minuten an einem Tecan Safire² (Tecan) bei $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ gemessen. Die Progresskurven wiesen im Fall von beiden Enzymen eine Krümmung auf. Aus diesem

Grund wurde die Geschwindigkeit durch lineare Regression der Messdaten von 1000 – 1800 Sekunden im Fall von PC1/3 und von 0 - 600 Sekunden im Fall von PC2 der Progresskurven bestimmt. Die Geschwindigkeit in Abwesenheit des Inhibitors wurde als 100 % festgesetzt.

5.3. Synthese der Inhibitoren

Die Synthese der Peptide wurde an der festen Phase nach einem Standard-Protokoll mit Fmoc-Aminosäuren durchgeführt (Abschnitt 5.3.1, Methode A). Es wurde ein orthogonales Schutzgruppenprinzip mit säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen genutzt. Die verwendeten Aminosäurederivate sind in Tabelle 18 aufgeführt. Die C-terminale Modifikation des Peptidbausteins erfolgte durch Lösungssynthese. Die Berechnung nachgeschalteter Reaktionen beruhte auf der initialen Beladung des Harzes mit der ersten Aminosäure. Die finalen Inhibitoren wurden mittels präparativer HPLC gereinigt, aus 80 % *tert*-Butanol in Wasser oder reinem Wasser lyophilisiert und als TFA-Salze erhalten. Die angegebene Reinheit der Verbindungen bezieht sich auf die HPLC-Analytik bei 220 nm.

Tabelle 18: Für die Festphasenpeptidsynthese verwendete Fmoc-Aminosäurederivate. Die angegebene Schutzgruppe bezieht sich auf die Seitenkette. Wenn keine Konfiguration angegeben ist, handelt es sich um ein Derivat in L-Konfiguration.

| Aminosäurederivat | Mw (g/mol) | 1-Buchstaben- Code | 3-Buchstaben- Code |
|---|---------------|-----------------------|-----------------------|
| Fmoc-Ala-OH \times H ₂ O | 329,4 | A | Ala |
| Fmoc-Glu(OtBu)-OH \times H ₂ O | 443,5 | E | Glu |
| Fmoc-Phe-OH | 387,4 | F | Phe |
| Fmoc-Gly-OH | 297,3 | G | Gly |
| Fmoc-Ile-OH | 353,4 | I | Ile |
| Fmoc-Lys(Boc)-OH | 468,5 | K | Lys |
| Fmoc-Lys(Dde)-OH | 532,6 | — | — |
| Fmoc-Leu-OH | 353,4 | L | Leu |
| Fmoc-Met-OH | 371,5 | M | Met |
| Fmoc-Asn(Trt)-OH | 596,7 | N | Asn |
| Fmoc-Gln(Trt)-OH | 610,7 | Q | Gln |
| Fmoc-Arg(Pbf)-OH | 648,8 | R | Arg |
| Fmoc-Val-OH | 339,4 | V | Val |
| Fmoc-Trp(Boc)-OH | 526,6 | W | Trp |
| Fmoc-Tyr(tBu)-OH | 459,6 | Y | Tyr |
| Fmoc-Penicillamin(Trt)-OH | 613,8 | — | Pen |
| Fmoc-Norleucine-OH | 353,4 | — | Nle |
| Fmoc- β -Cyclohexylalanin-OH | 393,5 | — | Cha |
| Fmoc- β -Cyclopropylalanin-OH | 351,4 | — | Cpa |
| Fmoc-Norvalin-OH | 339,4 | — | Nva |
| Fmoc- <i>tert</i> -Leucin-OH | 353,4 | — | Tle |
| Fmoc- <i>tert</i> -butyl Alanin-OH | 367,4 | — | Tba |
| Fmoc-2-Aminobuttersäure-OH | 325,4 | — | 2-Abu |
| Fmoc-1-Adamantylglycin-OH | 431,5 | — | 1-Adg |
| Fmoc- α -Methylalanin-OH | 325,4 | — | Aib |
| Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH | 648,8 | r | DArg |

5.3.1. Generelle Methoden

Methode A: Festphasenpeptidsynthese

Automatisierte Synthese im Syro 2000

Zu Beginn wurden ca. 120 mg trockenes Harz in eine 2 mL Spritze mit PTFE-Fritte eingewogen. Die Programmierungen des ersten und der nachfolgenden Zyklen sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Für die Doppelkupplungen wurde ein 4-facher Überschuss der jeweiligen Fmoc-Aminosäure, des Additivs HOBt und des Kupplungsreagenzes HBTU sowie ein 8-facher Überschuss an DIPEA in DMF, bezogen auf die initiale Beladung des Harzes, verwendet. Es wurden standardmäßig Doppelkupplungen durchgeführt. Nach Beendigung der Synthese wurde das Harz je dreimal mit DMF sowie DCM gewaschen und *in vacuo* getrocknet.

Tabelle 19: Programmierung des Peptidsyntheseroboters für den ersten und die nachfolgenden Zyklen der SPPS.

Erster Zyklus

| Schritt | Aktion | Reagenzien | Zyklen | Zeit (min) |
|---------|-----------------|--|--------|------------|
| 1 | Quellen | DMF | 2 | 10 |
| 2 | Fmoc-Abspaltung | Piperidin/DMF/NMP ¹ (1:1:1) | 2 | 5+25 |
| 3 | Waschen | DMF | 7 | 1 |
| 4 | Kupplung | (Fmoc-AS/HOBt/HBTU/DIPEA) ² | 2 | 95 |
| 5 | Waschen | DMF | 2 | 1 |

nachfolgende Zyklen

| Schritt | Aktion | Reagenzien | Zyklen | Zeit (min) |
|---------|-----------------|--|--------|-------------------|
| 1 | Waschen | DMF | 2 | 1 |
| 2 | Fmoc-Abspaltung | Piperidin/DMF/NMP ¹ (1:1:1) | 2 | 5+15 ³ |
| 3 | Waschen | DMF | 7 | 1 |
| 5 | Kupplung | (Fmoc-AS/HOBt/HBTU/DIPEA) ² | 2 | 95 |
| 6 | Waschen | DMF | 2 | 1 |

¹ versetzt mit Triton-X 100, 1 % (w/v)

² im Molverhältnis 4:4:4:8 (bezogen auf die initiale Beladung des Harzes)

³ ab 10. Zyklus: 20 Minuten bei der 2. Abspaltung

Manuelle Synthese

Die manuelle Festphasenpeptidsynthese wurde analog der automatisierten Synthese in einem Reaktionsgefäß mit eingeschmolzener Glassinterfritte oder 2 mL Spritzen aus Polypropylen mit Polyethylenfritten durchgeführt. Im Unterschied zur automatisierten Synthese wurden nur Einzelkupplungen durchgeführt und die Fmoc-Abspaltung erfolgte mit einer 20 %igen Lösung aus Piperidin in DMF (v/v).

Methode B: Beladung des 2Cl-Tritylchlorid Harz

1,0 eq der Fmoc-AS und 4,0 eq DIPEA wurde in trockenem DCM (1,0 mL pro 0,100 g 2Cl-Trt-Cl-Harz) gelöst und zu 1,0 eq des trockenen Harzes (Beladung nach Herstellerangaben 1,55 mmol/g) gegeben. Der Ansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde abgesaugt und das Harz dreimal 1 min mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1, (v/v/v)) behandelt. Im Anschluss wurde das Harz je dreimal mit DCM, DMF und erneut DCM gewaschen, bevor das Harz *in vacuo* getrocknet wurde.

Methode C: Beladung des Tritylchlorid-Harzes

4,0 eq des Diamins wurden in trockenem THF (1,5 mL pro 0,100 g Trt-Cl-Harz) gelöst und zu 1,0 eq des trockenen Harzes gegeben (Beladung nach Herstellerangaben 1,5 mmol/g). Die Suspension wurde 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde abgesaugt und das Harz dreimal 1 min mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1, (v/v/v)) behandelt. Im Anschluss wurde das Harz je dreimal mit DCM, DMF und erneut DCM gewaschen, bevor das Harz *in vacuo* getrocknet wurde.

Methode D: Mild-saure Harzabspaltung unter Erhalt der Schutzgruppen

Nach Beendigung der Festphasenpeptidsynthese wurde das harzgebundene Peptid mit 1 % TFA in DCM (1,5 mL pro 0,100 g unbeladenes Harz) für 30 min geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde in einen Spitzkolben überführt, mit DIPEA neutralisiert und *in vacuo* direkt vom Lösungsmittel befreit. Um eine vollständige Abspaltung zu erzielen, wurde dieser Vorgang zweimal wiederholt. Die Rückstände wurden vereint und im Vakuum getrocknet.

Methode E: Kupplung des 4-Amidinobenzylamins \times 2 HCl

Zu dem in DMF gelöstem Rohpeptid (ca. 0,10 mmol/mL) wurden 1,0 eq 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl, 1,1 eq PyBOP, 3,0 eq 6-Cl-HOBt sowie 7,0 eq DIPEA gegeben. Der Ansatz wurde 2 h bei RT gerührt, bevor mittels HPLC der Reaktionsumsatz

geprüft wurde. Bei einer unvollständigen Reaktion wurde entsprechend des HPLC-Chromatogramms nachgekuppelt. Nach fast vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

Methode F: Stark saure Harz- und Schutzgruppenabspaltung

Um gleichzeitig eine komplette Harz- und Schutzgruppenabspaltung oder nach bereits erfolgter Harzabspaltung eine Schutzgruppenabspaltung zu erreichen, wurde das Harz bzw. das abgespaltene Rohpeptid mit einer Lösung aus TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5, (v/v/v), ca. 2,5 mL pro 100 mg Fmoc-Arg(Pbf)-beladenes 2Cl-Trt-Cl-Harz) versetzt und 3 h bei RT geschüttelt. Die Abspatlösung wurde in einen ca. 10-fachen Überschuss an Diethylether getropft. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und dreimal mit Ether gewaschen sowie *in vacuo* getrocknet. Die Vollständigkeit der Schutzgruppenabspaltung wurde mittels HPLC kontrolliert. Bei unvollständiger Abspaltung wurde die Prozedur mit dem Präzipitat wiederholt.

Methode G: Aufbau einer Guanidinogruppe

Das erhaltenen Rohpeptid einer Synthese mit ca. 120 mg Harz wurde in 1 mL 1M Na₂CO₃ gelöst und mit 3,0 eq 1-*H*-Pyrazolcarboxamidin × HCl versetzt.¹⁸⁷ Die Lösung wurde 16 h bei RT gerührt und der Reaktionsverlauf mittels HPLC kontrolliert. Bei unvollständiger Reaktion wurde entsprechend des HPLC-Chromatogramms weiteres 1-*H*-Pyrazolcarboxamidin × HCl hinzugefügt. Nach nahezu vollständigem Umsatz wurde die Lösung mit TFA angesäuert und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt.

Methode H: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe in Lösung

Das Rohpeptid wurde mit 10 % Diethylamin in DMF (0,3 mL pro 0,15 mmol der initialen Harzbeladung) versetzt und für 2 h gerührt.¹⁸⁸ Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand ohne Reinigung weiter umgesetzt.

5.3.2. Synthese der Vorstufen

4-Amidinobenzylamin × 2 HCl (4-Amba)

1,0 eq Boc-4-acetylhydroxyamidinobenzylamid (19,25 g, 62,6 mmol)¹⁸⁹ wurde in 260 mL 90 % Essigsäure gelöst und unter N₂-Atmosphäre mit 1,5 g Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd/C) versetzt. Der Ansatz wurde bei Normaldruck mit H₂ über 96 h hydriert und der

Reaktionsverlauf mittels HPLC kontrolliert. Nach vollständiger Reaktion wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der ölige Rückstand wurde in Wasser gelöst und mit Ethylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde eingeeengt und bei RT mit 80 mL 32 %iger HCl versetzt und 4 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde nochmals mit H₂O aufgenommen und die Prozedur wiederholt, um eine möglichst vollständige Entfernung der HCl zu erreichen, bevor der Rückstand aus reinem Wasser lyophilisiert wurde.

Ausbeute: 10,52 g (75,7 % der Theorie, 47,4 mmol), weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 5,9 %; MS ber. m/z: 149,09, MS gef. m/z: 150,11 (M+H)⁺.

¹H NMR: 500 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 4.12 (s, 2 H), 7.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H), 7.90 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H), 8.79 (br. s, 3 H), 9.36 (s, 2 H), 9.53 (s, 2 H).

¹³C-NMR: 125 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 41.5; 127.6; 128.2; 129.2; 140.0; 165.2.

Boc-Tranexamsäure (Boc-Tra-OH)

1,0 eq Tranexamsäure (7,86 g, 50,0 mmol) wurde in 200 mL ACN/H₂O/1 N NaOH (2/1/1, v/v/v) gelöst und bei 0 °C 10 Minuten gerührt. Dann wurden 1,1 eq. Di-*tert*-butyl-Dicarbonat (12,02 g, 55,0 mmol) in 10 mL Acetonitril angelöst und zu der Lösung gegeben. Das Eisbad wurde nach 10 Minuten entfernt und die Lösung für 4 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wurde jeweils dreimal mit 5 % KHSO₄- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 11,01 g (85,5 % der Theorie, 42,8 mmol); weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 43,8 %; MS: ber. 257,16 (M), gef.: 258,20 (M+H)⁺

¹H NMR: 500 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 0.78 - 0.93 (m, 2 H), 1.19 - 1.33 (m, 3 H), 1.37 (s, 9 H), 1.64 - 1.73 (m, 2 H), 1.81 - 1.93 (m, 2 H), 2.04 - 2.15 (m, 1 H), 2.76 (t, *J* = 6.3 Hz, 2 H), 6.75 (t, *J* = 5.2 Hz, 1 H), 11.91 (br. s, 1 H).

¹³C-NMR: 125 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 28.4, 29.5, 37.5, 42.7, 46.1, 77.4, 155.8, 177.8.

Fmoc-Tle-OH

1,0 eq H-Tle-OH (2,00 g, 15,2 mmol) und 1,0 eq DIPEA (2,65 mL, 15,2 mmol) wurden in 60 mL ACN/H₂O (2:1, v/v) suspendiert. Die Suspension wurde 10 Minuten bei 0 °C gerührt, bevor eine Lösung aus 0,9 Äquivalente Fmoc-OSu (4,62 g, 13,7 mmol) in 20 mL ACN zugegeben wurde. Nach 1 h wurde das Eisbad entfernt und der Ansatz wurde bei

Raumtemperatur über Nacht gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels HPLC kontrolliert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wurde jeweils dreimal mit 5% KHSO_4 - und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4,71 g (87,4 % der Theorie, 13,33 mmol); weißes Pulver; Reinheit: 94,7 %; HPLC (% B): 61,8 %; MS: ber. 353,16 (M), gef.: 354,22 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

¹H NMR: 500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; δ (ppm) = 0.99 (s, 9 H), 3.87 (d, $J = 9.2$ Hz, 1 H), 4.16 - 4.36 (m, 3 H), 7.26 - 7.37 (m, 2 H), 7.37 - 7.46 (m, 2 H), 7.54 (d, $J = 9.2$ Hz, 1 H), 7.70 - 7.81 (m, 2 H), 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 12.54 (br. s, 1 H).

¹³C-NMR: 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; δ (ppm) = 26.7, 33.3, 46.6, 62.7, 65.8, 120.0, 125.4, 127.0, 127.6, 140.1, 143.8, 156.3, 172.6.

5.3.3. Synthese der Inhibitores des Typs R-Phac-Arg-P3-Arg-4-Amba

2Cl-Trt-Cl-Harz (0,12 g) wurde mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH nach Methode B beladen. Die weiteren Fmoc-Aminosäuren und die Phenyllessigsäure bzw. deren substituierte Derivate wurden durch manuelle SPPS gekuppelt (Methode A). Im Fall von Boc-3- bzw. Boc-4-Aminomethylphenyllessigsäure wurde für die Kupplung aufgrund des hohen Preises dieser Verbindungen nur der 2,5-fache Überschuss verwendet. Die Peptide wurden mild-sauer unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten (Methode D) und nach Methode E mit 4-Amidinobenzylamin $\times 2$ HCl gekuppelt. Die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte nach Methode F. Die Verbindungen mit 3- oder 4-Aminomethylphenylacetyl-Rest wurden abschließend nach Methode G in die analogen Guanidine überführt. Die finalen Inhibitoren wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

MI-1139 Phac-Arg-Aib-Arg-4-Amba $\times 3$ TFA

Ausbeute: 14,1 mg; weißes Pulver; Reinheit: 98,6 %; HPLC (% B): 23,29; MS ber. m/z: 664,39 (M), MS gef. m/z: 333,25 ($\text{M}+2\text{H}$)²⁺/2.

MI-1147 Phac-Arg-Adg-Arg-4-Amba $\times 3$ TFA

Ausbeute: 4,9 mg; weißes Pulver; Reinheit: 95,3 %; HPLC (% B): 33,72; MS ber. m/z: 770,47 (M), MS gef. m/z: 771,50 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

MI-1117 Phac-Arg-Abu-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 16,4 mg; weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 24,03; MS ber. m/z: 664,39 (M), MS gef. m/z: 333,35 (M+2H)²⁺/2.

MI-1116 Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 32,6 mg; weißes Pulver; Reinheit: 96,1 %; HPLC (% B): 27,82; MS ber. m/z: 692,42 (M), MS gef. m/z: 347,35 (M+2H)²⁺/2.

MI-1140 Phac-Arg-Tba-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 15,3 mg; weißes Pulver; Reinheit: 96,8 %; HPLC (% B): 29,81; MS ber. m/z: 706,44 (M), MS gef. m/z: 354,29 (M+2H)²⁺/2.

MI-1115 Phac-Arg-Nva-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 18,7 mg; weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 26,12; MS ber. m/z: 678,83 (M), MS gef. m/z: 340,28 (M+2H)²⁺/2.

MI-1138 Phac-Arg-Cpa-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 9,7 mg; weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 26,53; MS ber. m/z: 690,41 (M), MS gef. m/z: 346,30 (M+2H)²⁺/2.

MI-1134 Phac-Arg-Cha-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 27,8 mg; weißes Pulver; Reinheit: 97,7 %; HPLC (% B): 33,17; MS ber. m/z: 732,45 (M), MS gef. m/z: 733,43 (M+H)⁺.

MI-1137 Phac-Arg-Nle-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 22,1 mg; weißes Pulver; Reinheit: 97,0 %; HPLC (% B): 28,4; MS ber. m/z: 692,42 (M), MS gef. m/z: 346,36 (M+2H)²⁺/2.

MI-1182 Phac-Arg-Pen-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 41,8 mg; weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 27,3; MS ber. m/z: 710,38 (M), MS gef. m/z: 711,38 (M+H)⁺.

MI-1136 4-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba \times 4 TFA

Ausbeute: 39,9 mg; weißes Pulver; Reinheit: 96,9 %; HPLC (% B): 19,9; MS ber. m/z: 721,45 (M), MS gef. m/z: 722,1 (M+H)⁺; Elementaranalyse: ber. C (%): 43.84; H (%): 5.05; N (%): 15.46; gef. C (%): 42.83; H (%): 5.25; N (%): 15.19.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 0.87 (s, 9 H), 1.34 - 1.64 (m, 6 H), 1.64 - 1.76 (m, 2 H), 2.98 - 3.17 (m, 4 H), 3.45 - 3.58 (m, 2 H), 4.00 (s, 2 H), 4.16 - 4.39 (m, 4 H), 4.44 (dd, *J* = 16.0, 6.3 Hz, 1 H), 6.82 - 7.62 (m, 15 H), 7.71 - 7.87 (m, 4 H), 8.12 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 8.23 (br. s., 3 H), 8.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 8.6 (t, *J* = 6.16 Hz, 1 H), 9.17 - 9.42 (m, 4 H).

¹³C-NMR: 125 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 25.05, 25.14, 26.5, 28.6, 28.7, 34.3, 40.3, 40.4, 41.5, 41.7, 42.0, 52.3, 52.5, 59.5, 126.4, 127.2, 127.9, 128.6, 129.2, 132.0, 136.6, 145.7, 156.8, 165.4, 169.8, 170.2, 171.0, 171.4.

MI-1148 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba × 4 TFA

Ausbeute: 13,5 mg; weißes Pulver; Reinheit: 95,9 %; HPLC (% B): 20,9; MS ber. *m/z*: 763,47 (M), MS gef. *m/z*: 764,35 (M+H)⁺; Elementaranalyse: ber. C (%): 43,32; H (%): 5,04; N (%): 17,22; gef. C (%): 42,21; H (%): 5,31; N (%): 17,07.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 0.86 (s, 9 H), 1.37 - 1.63 (m, 6 H), 1.63 - 1.76 (m, 2 H), 3.00 - 3.17 (m, 4 H), 3.43 - 3.56 (m, 2 H), 4.20 - 4.39 (m, 6 H), 4.44 (dd, *J* = 16.18, 6.16 Hz, 1 H), 6.76 - 7.62 (m, 19 H), 7.72 - 7.83 (m, 4 H), 8.07 - 8.18 (m, 2 H), 8.41 (d, *J* = 8.02 Hz, 1 H), 8.56 - 8.64 (m, 1 H), 9.21 - 9.41 (m, 4 H).

¹³C-NMR: 125 MHz, DMSO-*d*₆; δ (ppm) = 25.1, 25.2, 26.5, 28.5, 28.7, 34.3, 40.3, 40.4, 41.5, 41.7, 43.7, 52.3, 52.5, 59.5, 126.5, 127.1, 127.2, 127.9, 129.2, 135.2, 135.5, 145.7, 156.8, 156.9, 165.4, 169.8, 170.4, 171.0, 171.4.

MI-1149 3-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba × 4 TFA

Ausbeute: 13,4 mg; weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 20,8; MS ber. *m/z*: 721,45 (M), MS gef. *m/z*: 722,5 (M+H)⁺.

MI-1150 3-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba × 4 TFA

Ausbeute: 13,0 mg; weißes Pulver; Reinheit: 96,5 %; HPLC (% B): 21,3; MS ber. *m/z*: 763,47 (M), MS gef. *m/z*: 764,35 (M+H)⁺.

5.3.4. Synthese der P4 - P1-Derivate

2Cl-Trt-Cl-Harz (0,12 g) wurde mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH nach Methode B beladen. Die weiteren Fmoc-Aminosäuren und die Boc-3- oder 4-Aminomethylphenyllessigsäure bzw. Boc-Aminovaleriansäure wurden durch manuelle SPPS gekuppelt (Methode A). Die Peptide wurden mild-saurer unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten

(Methode D) und nach Methode E mit 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl gekuppelt. Es folgte die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen nach Methode F und der Aufbau der N-terminalen Guanidinogruppe nach Methode G. Die finalen Inhibitoren wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

MI-0059 3-AMe-Phac-Val-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 38,8 mg; weißes Pulver; Reinheit: $> 99,0 \%$; HPLC (% B): 20,3; MS ber. m/z: 551,33 (M), MS gef. m/z: 552,40 (M+H)⁺.

MI-0060 4-AMe-Phac-Val-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 42,4 mg; weißes Pulver; Reinheit: $> 99,0 \%$; HPLC (% B): 19,6; MS ber. m/z: 551,33 (M), MS gef. m/z: 552,30 (M+H)⁺.

MI-0061 3-GMe-Phac-Val-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 19,0 mg; weißes Pulver; Reinheit: 96,4 %; HPLC (% B): 21,8; MS ber. m/z: 593,36 (M), MS gef. m/z: 594,30 (M+H)⁺.

MI-0062 4-GMe-Phac-Val-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 20,1 mg; weißes Pulver; Reinheit: 95,2 %; HPLC (% B): 21,1; MS ber. m/z: 593,36 (M), MS gef. m/z: 594,20 (M+H)⁺.

MI-1135 Ava-Val-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 18,7 mg; weißes Pulver; Reinheit: $> 99,0 \%$; HPLC (% B): 17,0; MS ber. m/z: 503,33 (M), MS gef. m/z: 504,10 (M+H)⁺.

MI-1146 Gua-Ava-Val-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 6,6 mg; weißes Pulver; Reinheit: $> 99,0 \%$; HPLC (% B): 18,7; MS ber. m/z: 545,36 (M), MS gef. m/z: 546,33 (M+H)⁺.

MI-1151 Ava-Tle-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 12,1 mg; weißes Pulver; Reinheit: 96,5 %; HPLC (% B): 18,6; MS ber. m/z: 517,35 (M), MS gef. m/z: 518,15 (M+H)⁺.

MI-1152 Gua-Ava-Tle-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 29,6 mg; weißes Pulver; Reinheit: 98,5%; HPLC (% B): 20,3; MS ber. m/z: 559,37 (M), MS gef. m/z: 560,24 (M+H)⁺.

5.3.5. Weitere Modifizierungen im N-terminalen Segment

2Cl-Trt-Cl-Harz (0,12 g) wurde mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH nach Methode B beladen. Die weiteren Fmoc-Aminosäuren und die Phenyllessigsäure bzw. Boc-Tranexamsäure wurden durch manuelle SPPS gekuppelt (Methode A). Unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen wurden die Peptide vom Harz abgespalten (Methode D) und nach Methode E 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl gekuppelt. Es folgte die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen nach Methode F.

Im Fall des Inhibitors **MI-1131** erfolgte der Aufbau der N-terminalen Guanidinogruppe nach Methode G.

Im Fall der Inhibitoren **MI-1158**, **MI-1184** – **1187** erfolgte zunächst die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach Methode H, bevor die Seitenkettenschutzgruppen nach Methode F abgespalten wurden.

Die finalen Inhibitoren wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

MI-1102 Phac-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 4 TFA

Ausbeute: 22,3 mg; weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 24,1; MS ber. m/z: 834,51 (M), MS gef. m/z: 835,33 (M+H)⁺.

MI-1103 Phac-Arg-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 5 TFA

Ausbeute: 17,8 mg; weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 23,5; MS ber. m/z: 990,61 (M), MS gef. m/z: 496,27 (M+2H)²⁺/2.

MI-1104 Phac-Arg-Ala-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 4 TFA

Ausbeute: 15,4 mg; weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 22,6; MS ber. m/z: 905,55 (M), MS gef. m/z: 906,54 (M+H)⁺.

MI-1105 Phac-Ala-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 4 TFA

Ausbeute: 20,3 mg; weißes Pulver; Reinheit: 95,2 %; HPLC (% B): 24,8; MS ber. m/z: 905,55 (M), MS gef. m/z: 453,73 (M+2H)²⁺/2.

MI-1130 Tra-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 4 TFA

Ausbeute: 22,1 mg; weißes Pulver; Reinheit: 97,0 %; HPLC (% B): 17,9; MS ber. m/z: 699,47 (M), MS gef. m/z 700,51 (M+H)⁺.

MI-1131 GTra-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 4 TFA

Ausbeute: 13,4 mg; weißes Pulver; Reinheit: 96,4 %; HPLC (% B): 20,5; MS ber. m/z: 741,49 (M), MS gef. m/z: 371,83 (M+2H)²⁺/2.

MI-1158 H-Arg-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 6 TFA

Ausbeute: 11,4 mg; weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 16,86; MS ber. m/z: 872,57 (M), MS gef. m/z: 437,29 (M+2H)²⁺/2; Elementaranalyse: ber. C (%): 37,79; H (%): 4,79; N (%): 17,99; gef. C (%): 35,91; H (%): 5,24; N (%): 16,66.

MI-1184 H-dArg-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 6 TFA

Ausbeute: 18,5 mg; weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 17,30; MS ber. m/z: 872,57 (M), MS gef. m/z: 873,43 (M+H)⁺; Elementaranalyse: ber. C (%): 37,79; H (%): 4,79; N (%): 17,99; gef. C (%): 36,03; H (%): 5,19; N (%): 16,82.

MI-1185 H-dArg-dArg-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 6 TFA

Ausbeute: 13,5 mg; weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 16,50; MS ber. m/z: 872,57 (M), MS gef. m/z: 873,53 (M+H)⁺.

MI-1186 H-dArg-dArg-dArg-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 7 TFA

Ausbeute: 22,0 mg; weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 17,50; MS ber. m/z: 1028,67 (M), MS gef. m/z: 1029,66 (M+H)⁺.

MI-1187 H-dArg-dArg-dArg-dArg-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 8 TFA

Ausbeute: 2,6 mg; weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 18,09; MS ber. m/z: 1184,77 (M), MS gef. m/z: 593,53 (M+2H)²⁺/2.

5.3.6. Kombination basischer P5-Reste mit Glu in P3

2Cl-Trt-Cl-Harz (0,12 g) wurde mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH nach Methode B beladen. Die weiteren Fmoc-Aminosäuren und die 4-Aminomethylphenylessigsäure wurden durch

manuelle SPPS gekuppelt (Methode A). Unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen wurde das Peptid vom Harz abgespalten (Methode D) und nach Methode E mit 4-Amidinobenzylamin $\times 2$ HCl gekuppelt. Es folgte die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen nach Methode F. Der Aufbau der N-terminalen Guanidinofunktion erfolgte nach Methode G. Die finalen Inhibitoren wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

MI-1183 4-AMe-Phac-Arg-Glu-Arg-4-Amba $\times 4$ TFA

Ausbeute: 8,1 mg; weißes Pulver; Reinheit: $> 99,0 \%$; HPLC (% B): 16,0; MS ber. m/z: 737,41 (M), MS gef. m/z: 738,34 (M+H)⁺.

MI-1188 4-GMe-Phac-Arg-Glu-Arg-4-Amba $\times 4$ TFA

Ausbeute: 12,7 mg; weißes Pulver; Reinheit: $97,0 \%$; HPLC (% B): 17,8; MS ber. m/z: 779,89 (M), MS gef. m/z: 780,41 (M+H)⁺.

5.3.7. Synthese der Noragmatin- und Agmatin- Derivate

Die Synthese dieser Verbindungen erfolgte im Rahmen eines Praktikums im Arbeitskreis von Prof. Dr. Künzel an der Hochschule Ansbach durch die Studentinnen Davina Guhr und Jasmin Wolf. Die präparative Reinigung und die enzymkinetische Charakterisierung der Verbindungen wurden in unserem Arbeitskreis durchgeführt.

Trt-Cl-Harz (0,12 g) wurde mit dem 1,4-Diaminobutan bzw. 1,3-Diaminopropan nach Methode C beladen.¹³⁵ Die weiteren Fmoc-Aminosäuren und die 3- bzw. 4-Fmoc-Aminomethylphenylelessigsäure wurden durch manuelle SPPS gekuppelt (Methode A). Die Harz- und Schutzgruppenabspaltung erfolgte nach Methode F. Im Anschluss erfolgte die Guanylierung der Aminogruppe nach Methode G. Die finalen Inhibitoren wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

MI-0089 3-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Noragmatin $\times 4$ TFA

Ausbeute: 13,6 mg; weißes Pulver; Reinheit: $> 99,0 \%$; HPLC (% B): 20,7; MS ber. m/z: 730,48 (M), MS gef. m/z: 731,55 (M+H)⁺.

MI-0090 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Noragmatin $\times 4$ TFA

Ausbeute: 55,3 mg; weißes Pulver; Reinheit: $> 99,0 \%$; HPLC (% B): 20,1; MS ber. m/z: 730,48 (M), MS gef. m/z: 366,27 (M+2H)²⁺/2.

MI-0091 3-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Agmatin \times 4 TFA

Ausbeute: 36,5 mg; weißes Pulver; Reinheit: 94,8 %; HPLC (% B): 21,7; MS ber. m/z: 744,45 (M), MS gef. m/z: 373,27 (M+2H)²⁺/2.

MI-0092 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Agmatin \times 4 TFA

Ausbeute: 58,7 mg; weißes Pulver; Reinheit: 95,3 %; HPLC (% B): 20,5; MS ber. m/z: 744,50 (M), MS gef. m/z: 373,28 (M+2H)²⁺/2.

5.3.8. Palmitoyl-Derivate

Ausgehend von Fmoc-Arg(Pbf)-Tritylchlorid-Harz (0,12 g) wurden die weiteren Fmoc-Aminosäuren, die Palmitin- oder Phenyllessigsäure durch automatische SPPS gekuppelt (Methode A). Unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen wurden die Peptide vom Harz abgespalten (Methode D) und nach Methode E mit 4-Amidinobenzylamin \times 2 HCl gekuppelt. Es folgte die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen nach Methode F. Die finalen Inhibitoren wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Im Fall des Inhibitors **MI-1145** wurde Fmoc-Lys(Dde)-OH als P3-Aminosäure verwendet. Die Dde-Abspaltung erfolgte mit 2 % Hydrazin in DMF (3 \times 2 Minuten). Im Anschluss wurde Palmitinsäure an die Lys-Seitenkette unter Standardbedingungen (4-fache Überschüsse von Palmitinsäure, HBTU und HOBt sowie ein 8-facher Überschuss an DIPEA) gekuppelt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben für die Verbindungen **MI-1132** und **MI-1133** beschrieben.

MI-1132 Palmitoyl-Ado-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 18,9 mg; weißes Pulver; Reinheit: 98,7 %; HPLC (% B): 54,9; MS ber. m/z: 943,67 (M), MS gef. m/z: 944,40 (M+H)⁺.

MI-1133 Palmitoyl-Ado-Ado-Arg-Val-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 14,9 mg; weißes Pulver; Reinheit: 96,0 %; HPLC (% B): 55,3; MS ber. m/z: 1088,74 (M), MS gef. m/z: 1089,40 (M+H)⁺.

MI-1145 Phac-Arg-Lys(Palmitoyl)-Arg-4-Amba \times 3 TFA

Ausbeute: 5,5 mg; weißes Pulver; Reinheit: 97,6 %; HPLC (% B): 57,1; MS ber. m/z: 945,66 (M), MS gef. m/z: 473,91 (M+2H)²⁺/2.

5.3.9. Synthese der Zellpenetrierenden Peptidderivate

Ausgehend von Fmoc-Arg(Pbf)-Tritylchlorid-Harz (0,12 g) wurden die weiteren Fmoc-Aminosäuren und die Essigsäure durch automatische SPPS gekuppelt (Methode A). Unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen wurden die Peptide vom Harz abgespalten (Methode D) und nach Methode E mit 4-Aminobenzylamin \times 2 HCl gekuppelt. Es folgte die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen nach Methode F. Die finalen Inhibitoren wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

MI-1141 Ac-RQIKIWFQNRRMKWKKRVR-4-Amba \times 10 TFA

Ausbeute: 19,6 mg; weißes Pulver; Reinheit: 96,2 %; HPLC (% B): 32,795; MS ber. m/z: 2829,66 (M), MS gef. m/z: 944,82 (M+3H)³⁺/3; Elementaranalyse: ber. C(%): 45,66; H(%): 5,63; N(%): 16,22; gef. C(%): 43,81; H(%): 5,794; N(%): 15,05.

MI-1142 Ac-YGRKKRRQRRRVR-4-Amba \times 10 TFA

Ausbeute: 40,1 mg; weißes Pulver; Reinheit: 95,1 %; HPLC (% B): 21,149; MS ber. m/z: 1987,22 (M), MS gef. m/z: 663,70 (M+3H)³⁺/3; Elementaranalyse: ber. C(%): 40,31; H(%): 5,15; N(%): 17,91; gef. C(%): 39,65; H(%): 5,630; N(%): 17,94.

MI-1143 Ac-AGYLLGKINLKALAALAKKILRVR-4-Amba \times 7 TFA

Ausbeute: 10,4 mg; weißes Pulver; Reinheit: > 99,0 %; HPLC (% B): 45,584; MS ber. m/z: 2765,76 (M), MS gef. m/z: 923,27 (M+3H)³⁺/3; Elementaranalyse: ber. C(%): 48,84; H(%): 6,64; N(%): 14,93; gef. C(%): 46,19; H(%): 6,610; N(%): 13,52.

MI-1144 Ac-RRRRRRRVR-4-Amba \times 9 TFA

Ausbeute: 24,9 mg; weißes Pulver; Reinheit: 96,2 %; HPLC (% B): 20,392; MS ber. m/z: 1695,08 (M), MS gef. m/z: 566,22 (M+3H)³⁺/3; Elementaranalyse: ber. C(%): 37,69; H(%): 4,98; N(%): 19,75; gef. C(%): 37,34; H(%): 5,539; N(%): 20,19.

5.4. Synthese von 4-GMe-Phac-Arg-Lys(β -Ala-FITC)-Arg-4-Amba \times 4 TFA

2Cl-Trt-Cl-Harz (0,25 g, 0,39 mmol, 1 eq) wurde mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH nach Methode B beladen. Die Aminosäurederivate Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH sowie Fmoc-4-Aminomethylphenyllessigsäure wurden nach einem manuellen Syntheseprotokoll gekuppelt

(A). Die Guanylierung der 4-Aminomethylphenylelessigsäure erfolgte am Harz mit *N-N'*-Bis-Boc-1-Guanylpirazol (0,36 g, 1,16 mmol, 3 eq) und DIPEA (0,27 mL, 1,55 mmol, 4 eq).¹⁹⁰

¹⁹¹ Die Dde-Abspaltung erfolgte mit je 2 % Hydrazin in DMF (3 × 2 Minuten). Boc-β-Alanin wurde an die Seitenkette des Lysins nach Methode A gekuppelt. Die Harzabspaltung erfolgte mild-sauer mit 1% TFA in DCM (Methode D), wodurch das geschützte Peptid Bis-Boc-4-GMe-Phac-Arg(Pbf)-Lys(Boc-β-Ala)-Arg(Pbf)-OH erhalten wurde. Nach Methode E wurde 4-Amidinobenzylamin × 2 HCl gekuppelt und anschließend die Schutzgruppen nach Methode F abgespalten. Die Verbindung 4-GMe-Phac-Arg-Lys(β-Ala)-Arg-4-Amba × 5 TFA (**MI-1189**) wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 71,9 mg, weißes Pulver, Reinheit: 97,1 %; HPLC (% B): 18,0 % B; MS ber. m/z: 849,52 (M), MS gef. m/z: 426,02, (M+2H)²⁺/2).

4-GMe-Phac-Arg-Lys(β-Ala)-Arg-4-Amba (0,015 g, 0,011 mmol, 1 eq) wurde in 150 µL DMF gelöst. Zu dem Ansatz wurde DIPEA (9,2 µL, 0,005 mmol, 0,5 eq) sowie Fluorescein-isothiocyanat (FITC, Novabiochem; 0,004 g, 0,011 mmol, 1 eq) gegeben und unter Ausschluss von Licht über Nacht gerührt.¹⁹² Die Reaktionskontrolle mittels HPLC zeigte einen unvollständigen Umsatz, deshalb wurden weitere 0,75 eq FITC hinzugefügt und der Ansatz weitere 5 h gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit den Laufmitteln A und B (Abschnitt 5.1.3.2) verdünnt und direkt mittels präparativer HPLC gereinigt. Die Verbindung 4-GMe-Phac-Arg-Lys(β-Ala-Fluorescein)-Arg-4-Amba × 4 TFA (**MI-1190**) wurde lyophilisiert und lichtgeschützt gelagert.

Ausbeute: 14,3 mg, gelbes Pulver; Reinheit: 93,1 %; HPLC (% B): 29,1 % B; MS ber. m/z: 1238,56 (M), MS gef. m/z: 1239,87 (M+H)⁺.

5.5. Zellkulturversuche zur Lokalisation des FITC-markierten Furininhibitors mittels Immunofluoreszenz

Die Experimente wurden unter Anleitung von Dr. Eva Frieberthäuser am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

5.5.1. Verwendete Zelllinien

Human embryonic kidney (293T) Zellen und *human hepatocyte-derived carcinoma* (Huh7) Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10 % fetalem

Kälberserum (FCS; Gibco), Glutamin, Penicillin und Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

5.5.2. Western Blot und SDS-Page

293T-Zellen wurden mittels Lipofectamine 2000 (Invitrogen) mit pCAGGS-H7 transfiziert. Nach 6 h wurden die Inhibitoren in Konzentrationen von 15 und 50 µM (10 mM Stammlösung in DMSO, weitere Verdünnungen mit Medium) zu den Zellen gegeben und diese für 12 h inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in SDS-Probenpuffer resuspendiert und durch Ultraschall sowie Erhitzen auf 95 °C für 5 Minuten lysiert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-Page (12 % Polyacrylamidgel) aufgetrennt und durch Western Blot wurden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien) überführt. Die immunhistochemische Detektion der Proteine erfolgte mit dem primären Antikörper Anti-H7 und einem Meerrettich-Peroxidase konjugierten zweiten Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark), gefolgt von der Inkubation mit einem Chemilumineszenz-Substrat (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc.).

5.5.3. Immunofluoreszenz

Die auf Deckgläsern kultivierten Huh-7-Zellen wurden mit Methanol/Aceton (1:1) fixiert und permeabilisiert. Unspezifische Wechselwirkungen wurden durch Inkubation der Zellen mit Blocking-Puffer (2 % BSA, 5 % Glycerin, 0,2 % Tween 20 in PBS) für 30 min verhindert. Die Zellen wurden mit dem Antikörper α-TGN38 (BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland) für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, der Antikörper α-Hase Rhodamin und 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; Sigma Aldrich) in PBS zu den Zellen gegeben und erneut in einer feuchten Kammer 1 h inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Mowiol (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) auf Objektträgern fixiert. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde ein Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop verwendet.

5.6. Synthese des Fluoreszenzsubstrates Phac-Arg-Val-Arg-Arg-AMC (MI-0730)

Die Synthese erfolgte erstmals durch Dr. Gero Becker und wurde im Rahmen dieser Arbeit in einem größeren Maßstab wiederholt.¹²⁴ 2Cl-Trt-Cl-Harz (2,01 g, 3,12 mmol, 1,0 eq) wurde mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH (2,02 g, 3,12 mmol, 1 eq) nach Methode B beladen. Die folgenden

Fmoc-Aminosäurederivate und Phenylelessigsäure wurden nach einem manuellen Syntheseprotokoll gekuppelt (A). Die Harzabspaltung erfolgte mit 1 % TFA in DCM (Methode D), wodurch das Intermediat Phac-Arg(Pbf)-Val-Arg(Pbf)-OH als gelbes Öl erhalten wurde (HPLC (% B): 65,4 % B; MS ber. m/z: 1051,49, MS gef. m/z: 1052,43, (M+H)⁺).

Die Verbindung wurde ohne weitere Reinigung in 10 mL DMF mit H-Arg-AMC × 2 HCl (Pentapharm, Basel, Schweiz; 279,0 mg, 0,69 mmol, 0,75 eq) und PyAOP (359,8 mg, 0,69 mmol, 0,75 eq) gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DIPEA (320 µL, 1,84 mmol, 2 eq) gestartet und bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktionskontrolle mittels HPLC zeigte einen unvollständigen Umsatz; deshalb wurden weitere 0,5 eq H-Arg-AMC × 2 HCl (Pentapharm), PyAOP und 1,0 eq DIPEA hinzugefügt und der Ansatz weitere 5 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und die Schutzgruppen nach Methode F abgespalten. Das finale Substrat wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert. Ausbeute: 367,27 mg, weißes Pulver; Reinheit: 96,3 %; HPLC (% B): 31,84 % B; MS ber. m/z: 860,48 (M), MS gef. m/z: 861,40 (M+H)⁺.

5.7. Bestimmung der k_{cat}/K_m -Werte der Substrate mittels Progresskurven-Analyse

Die Hydrolyse der fluorogenen Substrate Pyr-RTKR-AMC (Bachem), Ac-RVRR-AMC¹²⁴ und Phac-RVRR-AMC¹²⁴ wurde in einem Reaktionsvolumen von 200 µL bei $\lambda_{ex} = 380$ nm und $\lambda_{em} = 460$ nm mit einem Fluoreszenz-Plattenleser Tecan Safire² (Tecan) bestimmt. Der Messansatz setzte sich aus 20 µL des jeweiligen Substrates (gelöst und verdünnt in Wasser), 160 µL Puffer (100 mM HEPES, 0,2 % Triton X-100, 2 mM CaCl₂, 0,02 % Natriumazid und 1 mg/mL BSA, pH 7,0) und 20 µL Enzymlösung zusammen. Die Messung erfolgte mit einer Substratkonzentration von 0,2 µM (< $K_m/10$) und einer Furinkonzentration von 19 nM jeweils im Messansatz über einen Zeitraum von 45 Minuten.¹⁸² Die Progresskurven wurden mittels nicht linearer Regression an Formel 7 für eine Reaktion 1. Ordnung angepasst und so k_{obs} berechnet.

Formel 7: Gleichung zur Berechnung der pseudo-erster Ordnungsgeschwindigkeitskonstante k_{obs} . (F(t): Fluoreszenz zum Zeitpunkt t, F_{max} : finale Fluoreszenz, F_{init} : initiale Fluoreszenz, k_{obs} : apparente pseudo-erster Ordnungsgeschwindigkeitskonstante, t: Zeit)

$$F(t) = (F_{max} - F_{init}) \times [1 - \exp(-k_{obs} \times t)] + F_{init}$$

Bei bekannter Enzymkonzentration kann man mittels k_{obs} den Term k_{cat}/K_m nach Formel 8 berechnen.

Formel 8: Gleichung zur Berechnung von k_{cat}/K_m . (k_{obs} : apparente pseudo-erster Ordnungsgeschwindigkeitskonstante, E_0 : Enzymkonzentration, k_{cat} : maximaler Substratumsatz eines Enzyms pro Zeiteinheit, K_m : Michaelis-Menten-Konstante)

$$\frac{k_{obs}}{E_0} = \frac{k_{cat}}{K_m}$$

6. Literaturverzeichnis

- [1] Puente, X. S.; Sanchez, L. M.; Overall, C. M.; López-Otín, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* **2003**, *4*, 544–558.
- [2] Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 785–799.
- [3] Rawlings, N. D.; Waller, M.; Barrett, A. J.; Bateman, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* **2013**, *42*, D503–D509.
- [4] López-Otín, C.; Matrisian, L. M. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7*, 800–808.
- [5] Creemers, J. W. M.; Khatib, A.-M. Knock-out mouse models of proprotein convertases: unique functions or redundancy? *Front Biosci* **2008**, *13*, 4960–4971.
- [6] Seidah, N. G.; Prat, A. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat Rev Drug Discov* **2012**, *11*, 367–383.
- [7] Taylor, N. A. Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *The FASEB Journal* **2003**, *17*, 1215–1227.
- [8] Roebroek, A. J. M.; Taylor, N. A.; Louagie, E.; Pauli, I.; Smeijers, L.; Snellinx, A.; Lauwers, A.; van de Ven, W. J. M.; Hartmann, D.; Creemers, J. W. M. Limited redundancy of the proprotein convertase furin in mouse liver. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 53442–53450.
- [9] Thomas, G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2002**, *3*, 753–766.
- [10] Henrich, S.; Lindberg, I.; Bode, W.; Than, M. Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: explanation of their specificity. *J Mol Biol* **2005**, *345*, 211–227.
- [11] Roebroek, A. J.; Schalken, J. A.; Leunissen, J. A.; Onnekink, C.; Bloemers, H. P.; van de Ven, W. J. Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *EMBO J* **1986**, *5*, 2197–2202.
- [12] Fuller, R. S.; Brake, A. J.; Thorner, J. Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* **1989**, *246*, 482–486.
- [13] van de Ven, W. J.; Voorberg, J.; Fontijn, R.; Pannekoek, H.; van den Ouweland, A. M.; van Duijnhoven, H. L.; Roebroek, A. J.; Siezen, R. J. Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol Biol Rep* **1990**, *14*, 265–275.
- [14] Seidah, N. G.; Day, R.; Marcinkiewicz, M.; Chretien, M. Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann N Y Acad Sci* **1998**, *839*, 9–24.

- [15] Thacker, C.; Rose, A. M. A look at the *Caenorhabditis elegans* Kex2/Subtilisin-like proprotein convertase family. *Bioessays* **2000**, *22*, 545–553.
- [16] Rockwell, N.; Krysan, D.; Komiyama, T.; Fuller, R. Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chem Rev* **2002**, *102*, 4525–4548.
- [17] Leduc, R.; Molloy, S. S.; Thorne, B. A.; Thomas, G. Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J Biol Chem* **1992**, *267*, 14304–14308.
- [18] Vey, M.; Schäfer, W.; Berghöfer, S.; Klenk, H. D.; Garten, W. Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J Cell Biol* **1994**, *127*, 1829–1842.
- [19] Henrich, S.; Cameron, A.; Bourenkov, G. P.; Kiefersauer, R.; Huber, R.; Lindberg, I.; Bode, W.; Than, M. E. The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol* **2003**, *10*, 520–526.
- [20] Anderson, E. D.; VanSlyke, J. K.; Thulin, C. D.; Jean, F.; Thomas, G. Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J* **1997**, *16*, 1508–1518.
- [21] Molloy, S. S.; Thomas, L.; VanSlyke, J. K.; Stenberg, P. E.; Thomas, G. Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J* **1994**, *13*, 18–33.
- [22] Schäfer, W.; Stroh, A.; Berghöfer, S.; Seiler, J.; Vey, M.; Kruse, M. L.; Kern, H. F.; Klenk, H. D.; Garten, W. Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J* **1995**, *14*, 2424–2435.
- [23] Takahashi, S.; Nakagawa, T.; Banno, T.; Watanabe, T.; Murakami, K.; Nakayama, K. Localization of furin to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface involves Ser and Tyr residues within the cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 28397–28401.
- [24] Molloy, S. S.; Anderson, E. D.; Jean, F.; Thomas, G. Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol* **1999**, *9*, 28–35.
- [25] Barr, V. A.; Phillips, S. A.; Taylor, S. I.; Haft, C. R. Overexpression of a novel sorting nexin, SNX15, affects endosome morphology and protein trafficking. *Traffic* **2000**, *1*, 904–916.
- [26] Nakayama, K. Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* **1997**, *327* (Pt 3), 625–635.
- [27] Bravo, D. A.; Gleason, J. B.; Sanchez, R. I.; Roth, R. A.; Fuller, R. S. Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin. Characterization and kinetic parameters using the purified, secreted soluble protease expressed by a recombinant baculovirus. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 25830–25837.
- [28] Willnow, T. E.; Moehring, J. M.; Inocencio, N. M.; Moehring, T. J.; Herz, J. The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro. *Biochem J* **1996**, *313* (Pt 1), 71–76.

- [29] Kozyraki, R.; Kristiansen, M.; Silahtaroglu, A.; Hansen, C.; Jacobsen, C.; Tommerup, N.; Verroust, P. J.; Moestrup, S. K. The human intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin: molecular characterization and chromosomal mapping of the gene to 10p within the autosomal recessive megaloblastic anemia (MGA1) region. *Blood* **1998**, *91*, 3593–3600.
- [30] Hendy, G. N.; Bennett, H. P.; Gibbs, B. F.; Lazure, C.; Day, R.; Seidah, N. G. Proparathyroid hormone is preferentially cleaved to parathyroid hormone by the prohormone convertase furin. A mass spectrometric study. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 9517–9525.
- [31] Denault, J. B.; Claing, A.; D'Orleans-Juste, P.; Sawamura, T.; Kido, T.; Masaki, T.; Leduc, R. Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett* **1995**, *362*, 276–280.
- [32] Seidah, N. G.; Benjannet, S.; Pareek, S.; Chretien, M.; Murphy, R. A. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett* **1996**, *379*, 247–250.
- [33] Dubois, C. M.; Laprise, M. H.; Blanchette, F.; Gentry, L. E.; Leduc, R. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 10618–10624.
- [34] Seidah, N. G.; Benjannet, S.; Pareek, S.; Savaria, D.; Hamelin, J.; Goulet, B.; Laliberte, J.; Lazure, C.; Chretien, M.; Murphy, R. A. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* **1996**, *314* (Pt 3), 951–960.
- [35] Cui, Y. BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *The EMBO Journal* **1998**, *17*, 4735–4743.
- [36] Elices, M. J.; Osborn, L.; Takada, Y.; Crouse, C.; Luhowskyj, S.; Hemler, M. E.; Lobb, R. R. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* **1990**, *60*, 577–584.
- [37] Bergeron, E.; Basak, A.; Decroly, E.; Seidah, N. Processing of alpha4 integrin by the proprotein convertases: histidine at position P6 regulates cleavage. *Biochem J* **2003**, *373*, 475–484.
- [38] Bennett, B. D.; Denis, P.; Haniu, M.; Teplow, D. B.; Kahn, S.; Louis, J. C.; Citron, M.; Vassar, R. A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 37712–37717.
- [39] Citron, M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9*, 387–398.
- [40] Bassi, D. E.; Lopez De Cicco, R.; Mahloogi, H.; Zucker, S.; Thomas, G.; Klein-Szanto, A. J. Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 10326–10331.
- [41] Bassi, D. E.; Fu, J.; Lopez de Cicco, R.; Klein-Szanto, A. J. P. Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression. *Mol Carcinog* **2005**, *44*, 151–161.

- [42] Scamuffa, N.; Siegfried, G.; Bontemps, Y.; Ma, L.; Basak, A.; Cherel, G.; Calvo, F.; Seidah, N.; Khatib, A.-M. Selective inhibition of proprotein convertases represses the metastatic potential of human colorectal tumor cells. *J Clin Invest* **2008**, *118*, 352–363.
- [43] D'Anjou, F.; Routhier, S.; Perreault, J.-P.; Latil, A.; Bonnel, D.; Fournier, I.; Salzet, M.; Day, R. Molecular Validation of PACE4 as a Target in Prostate Cancer. *Transl Oncol* **2011**, *4*, 157–172.
- [44] Müller, E. J.; Caldelari, R.; Posthaus, H. Role of subtilisin-like convertases in cadherin processing or the conundrum to stall cadherin function by convertase inhibitors in cancer therapy. *J Mol Histol* **2004**, *35*, 263–275.
- [45] Stawowy, P.; Fleck, E. Proprotein convertases furin and PC5: targeting atherosclerosis and restenosis at multiple levels. *J Mol Med (Berl)* **2005**, *83*, 865–875.
- [46] Pasquato, A.; Ramos da Palma, J.; Galan, C.; Seidah, N. G.; Kunz, S. Viral envelope glycoprotein processing by proprotein convertases. *Antiviral Res* **2013**, *99*, 49–60.
- [47] Zambon, M. C. The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol* **2001**, *11*, 227–241.
- [48] Steinmetzer, T. Strategies for development of new influenza medication. *Pharm Unserer Zeit* **2011**, *40*, 160–168.
- [49] Matrosovich, M.; Stech, J.; Klenk, H. D. Influenza receptors, polymerase and host range. *Rev Sci Tech* **2009**, *28*, 203–217.
- [50] Gamblin, S. J.; Skehel, J. J. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 28403–28409.
- [51] Marjuki, H.; Gornitzky, A.; Marathe, B. M.; Ilyushina, N. A.; Aldridge, J. R.; Desai, G.; Webby, R. J.; Webster, R. G. Influenza A virus-induced early activation of ERK and PI3K mediates V-ATPase-dependent intracellular pH change required for fusion. *Cellular Microbiology* **2011**, *13*, 587–601.
- [52] Zambon, M. C. Epidemiology and pathogenesis of influenza. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1999**, *44*, 3–9.
- [53] Garten, W.; Klenk, H. D. Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends Microbiol* **1999**, *7*, 99–100.
- [54] Garten, W.; Klenk, H.-D. Cleavage Activation of the Influenza Virus Hemagglutinin and Its Role in Pathogenesis. In *Avian Influenza*. Klenk, H.-D.; Matrosovich, M.; Stech, J., Eds.; Karger: Basel; pp. 156–167.
- [55] Cross, K. J.; Langley, W. A.; Russell, R. J.; Skehel, J. J.; Steinhauer, D. A. Composition and functions of the influenza fusion peptide. *Protein Pept Lett* **2009**, *16*, 766–778.
- [56] Gong, J.; Fang, H.; Li, M.; Liu, Y.; Yang, K.; Liu, Y.; Xu, W. Potential targets and their relevant inhibitors in anti-influenza fields. *Curr Med Chem* **2009**, *16*, 3716–3739.

- [57] Gabriel, G.; Klingel, K.; Otte, A.; Thiele, S.; Hudjetz, B.; Arman-Kalcek, G.; Sauter, M.; Schmidt, T.; Rother, F.; Baumgarte, S.; Keiner, B.; Hartmann, E.; Bader, M.; Brownlee, G. G.; Fodor, E.; Klenk, H.-D. Differential use of importin- α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus. *Nat Commun* **2011**, *2*, 156–162.
- [58] Skehel, J. J.; Wiley, D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **2000**, *69*, 531–569.
- [59] Webster, R. G.; Govorkova, E. A. Continuing challenges in influenza. *Ann N Y Acad Sci* **2014**, *1323*, 115–139.
- [60] Böttcher, E.; Matrosovich, T.; Beyerle, M.; Klenk, H.-D.; Garten, W.; Matrosovich, M. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* **2006**, *80*, 9896–9898.
- [61] Böttcher-Friebertshäuser, E.; Freuer, C.; Sielaff, F.; Schmidt, S.; Eickmann, M.; Uhendorf, J.; Steinmetzer, T.; Klenk, H. D.; Garten, W. Cleavage of Influenza Virus Hemagglutinin by Airway Proteases TMPRSS2 and HAT Differs in Subcellular Localization and Susceptibility to Protease Inhibitors. *Journal of Virology* **2010**, *84*, 5605–5614.
- [62] Stieneke-Gröber, A.; Vey, M.; Angliker, H.; Shaw, E.; Thomas, G.; Roberts, C.; Klenk, H. D.; Garten, W. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J* **1992**, *11*, 2407–2414.
- [63] Hatta, M.; Kawaoka, Y. The continued pandemic threat posed by avian influenza viruses in Hong Kong. *Trends Microbiol* **2002**, *10*, 340–344.
- [64] Ludwig, S.; Stitz, L.; Planz, O.; Van, H.; Fitch, W. M.; Scholtissek, C. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic? *Virology* **1995**, *212*, 555–561.
- [65] Pfeleiderer, M. Grippe-Impfstoffe. *Pharm Unserer Zeit* **2011**, *40*, 126–134.
- [66] Klebe, G.; Schlitzer, M. M2 inhibitors and neuraminidase inhibitors. *Pharm Unserer Zeit* **2011**, *40*, 144–150.
- [67] Boltz, D. A.; Aldridge, J. R.; Webster, R. G.; Govorkova, E. A. Drugs in Development for Influenza. *Drugs* **2010**, *70*, 1349–1362.
- [68] Beineke, A.; Puff, C.; Seehusen, F.; Baumgärtner, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2009**, *127*, 1–18.
- [69] Rohowsky-Kochan, C.; Dowling, P. C.; Cook, S. D. Canine distemper virus-specific antibodies in multiple sclerosis. *Neurology* **1995**, *45*, 1554–1560.
- [70] Bieringer, M.; Han, J. W.; Kendl, S.; Khosravi, M.; Plattet, P.; Schneider-Schaulies, J. Experimental adaptation of wild-type canine distemper virus (CDV) to the human entry receptor CD150. *PLoS One* **2013**, *8*, e57488.
- [71] Greene, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*; Elsevier/Saunders: St. Louis, Mo, 2012.

- [72] Messling, V. von; Milosevic, D.; Devaux, P.; Cattaneo, R. Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers: partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. *J Virol* **2004**, 78, 7894–7903.
- [73] Messling, V. von; Cattaneo, R. Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function. *J Virol* **2002**, 76, 4172–4180.
- [74] Harrison, M. S.; Sakaguchi, T.; Schmitt, A. P. Paramyxovirus assembly and budding: Building particles that transmit infections. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2010**, 42, 1416–1429.
- [75] Dixon, T. C.; Meselson, M.; Guillemin, J.; Hanna, P. C. Anthrax. *N Engl J Med* **1999**, 341, 815–826.
- [76] Young, J. A. T.; Collier, R. J. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu Rev Biochem* **2007**, 76, 243–265.
- [77] Liu, S.; Schubert, R. L.; Bugge, T. H.; Leppla, S. H. Anthrax toxin: structures, functions and tumour targeting. *Expert Opin Biol Ther* **2003**, 3, 843–853.
- [78] Liu, S.; Moayeri, M.; Leppla, S. H. Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. *Trends in Microbiology* **2014**, 22, 317–325.
- [79] Agrawal, A.; Pulendran, B. Anthrax lethal toxin: a weapon of multisystem destruction. *Cell Mol Life Sci* **2004**, 61, 2859–2865.
- [80] Mazumdar, S. Raxibacumab. *MAbs* **2009**, 1, 531–538.
- [81] Collier, R. J. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* **2001**, 39, 1793–1803.
- [82] Robert Koch-Institut. Diphtherie.
- [83] Hadfield, T. L.; McEvoy, P.; Polotsky, Y.; Tzinslerling, V. A.; Yakovlev, A. A. The Pathology of Diphtheria. *J Infect Dis* **2000**, 181, S116.
- [84] Pappenheimer, A. M., JR. Diphtheria toxin. *Annu Rev Biochem* **1977**, 46, 69–94.
- [85] Tsuneoka, M.; Nakayama, K.; Hatsuzawa, K.; Komada, M.; Kitamura, N.; Mekada, E. Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J Biol Chem* **1993**, 268, 26461–26465.
- [86] Collier, R. J. Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol Rev* **1975**, 39, 54–85.
- [87] Trujillo, C.; Ratts, R.; Tamayo, A.; Harrison, R.; Murphy, J. R. Trojan horse or proton force: finding the right partner(s) for toxin translocation. *Neurotox Res* **2006**, 9, 63–71.
- [88] Garten, W.; Hallenberger, S.; Ortmann, D.; Schäfer, W.; Vey, M.; Angliker, H.; Shaw, E.; Klenk, H. D. Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie* **1994**, 76, 217–225.

- [89] Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, O. D.; James, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* **2002**, *102*, 4639–4750.
- [90] Bontemps, Y.; Scamuffa, N.; Calvo, F.; Khatib, A.-M. Potential opportunity in the development of new therapeutic agents based on endogenous and exogenous inhibitors of the proprotein convertases. *Med Res Rev* **2007**, *27*, 631–648.
- [91] Basak, A. Inhibitors of proprotein convertases. *J Mol Med (Berl)* **2005**, *83*, 844–855.
- [92] Jean, F.; Stella, K.; Thomas, L.; Liu, G.; Xiang, Y.; Reason, A. J.; Thomas, G. alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 7293–7298.
- [93] Anderson, E. D.; Thomas, L.; Hayflick, J. S.; Thomas, G. Inhibition of HIV-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 24887–24891.
- [94] Watanabe, M.; Hirano, A.; Stenglein, S.; Nelson, J.; Thomas, G.; Wong, T. C. Engineered serine protease inhibitor prevents furin-catalyzed activation of the fusion glycoprotein and production of infectious measles virus. *J Virol* **1995**, *69*, 3206–3210.
- [95] Basak, A.; Lotfipour, F. Modulating furin activity with designed mini-PDX peptides: synthesis and in vitro kinetic evaluation. *FEBS Lett* **2005**, *579*, 4813–4821.
- [96] Lu, W.; Zhang, W.; Molloy, S. S.; Thomas, G.; Ryan, K.; Chiang, Y.; Anderson, S.; Laskowski, M., JR. Arg15-Lys17-Arg18 turkey ovomucoid third domain inhibits human furin. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 14583–14585.
- [97] Opal, S. M.; Artenstein, A. W.; Cristofaro, P. A.; Jhung, J. W.; Palardy, J. E.; Parejo, N. A.; Lim, Y.-P. Inter-alpha-inhibitor proteins are endogenous furin inhibitors and provide protection against experimental anthrax intoxication. *Infect Immun* **2005**, *73*, 5101–5105.
- [98] Opal, S. M.; Lim, Y.-P.; Cristofaro, P.; Artenstein, A. W.; Kessimian, N.; DelSesto, D.; Parejo, N.; Palardy, J. E.; Siryaporn, E. Inter- α Inhibitor Proteins. *Shock* **2011**, *35*, 42–44.
- [99] Komiyama, T.; Fuller, R. S. Engineered eglin c variants inhibit yeast and human proprotein processing proteases, Kex2 and furin. *Biochemistry* **2000**, *39*, 15156–15165.
- [100] Liu, Z.-x.; Fei, H.; Chi, C.-w. Two engineered eglin c mutants potently and selectively inhibiting kexin or furin. *FEBS Lett* **2004**, *556*, 116–120.
- [101] Barrett, A. J.; Starkey, P. M. The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem J* **1973**, *133*, 709–724.
- [102] van Rompaey, L.; Ayoubi, T.; van de Ven, W.; Marynen, P. Inhibition of intracellular proteolytic processing of soluble proproteins by an engineered alpha 2-macroglobulin containing a furin recognition sequence in the bait region. *Biochem J* **1997**, *326* (Pt 2), 507–514.
- [103] Dahlen, J. R.; Jean, F.; Thomas, G.; Foster, D. C.; Kisiel, W. Inhibition of soluble recombinant furin by human proteinase inhibitor 8. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 1851–1854.

- [104] Zhu, J.; Declercq, J.; Roucourt, B.; Ghassabeh, G. H.; Meulemans, S.; Kinne, J.; David, G.; Vermorken, A. J. M.; van de Ven, W. J. M.; Lindberg, I.; Muyldermans, S.; Creemers, J. W. M. Generation and characterization of non-competitive furin-inhibiting nanobodies. *Biochem J* **2012**, *448*, 73–82.
- [105] Garten, W.; Stieneke, A.; Shaw, E.; Wikstrom, P.; Klenk, H. D. Inhibition of proteolytic activation of influenza virus hemagglutinin by specific peptidyl chloroalkyl ketones. *Virology* **1989**, *172*, 25–31.
- [106] Hallenberger, S.; Bosch, V.; Angliker, H.; Shaw, E.; Klenk, H. D.; Garten, W. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **1992**, *360*, 358–361.
- [107] Hanson, S. R.; Harker, L. A. Interruption of acute platelet-dependent thrombosis by the synthetic antithrombin D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginyl chloromethyl ketone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, *85*, 3184–3188.
- [108] Angliker, H. Synthesis of tight binding inhibitors and their action on the proprotein-processing enzyme furin. *J Med Chem* **1995**, *38*, 4014–4018.
- [109] Zhong, M.; Munzer, J. S.; Basak, A.; Benjannet, S.; Mowla, S. J.; Decroly, E.; Chretien, M.; Seidah, N. G. The prosegments of furin and PC7 as potent inhibitors of proprotein convertases. In vitro and ex vivo assessment of their efficacy and selectivity. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 33913–33920.
- [110] Basak, A.; Chen, A.; Scamuffa, N.; Mohottalage, D.; Basak, S.; Khatib, A.-M. Blockade of furin activity and furin-induced tumor cells malignant phenotypes by the chemically synthesized human furin prodomain. *Curr Med Chem* **2010**, *17*, 2214–2221.
- [111] Lei, X.; Basu, D.; Li, Z.; Zhang, M.; Rudic, R. D.; Jiang, X.-C.; Jin, W. Hepatic overexpression of the prodomain of furin lessens progression of atherosclerosis and reduces vascular remodeling in response to injury. *Atherosclerosis* **2014**, *236*, 121–130.
- [112] Basak, A.; Lazure, C. Synthetic peptides derived from the prosegments of proprotein convertase 1/3 and furin are potent inhibitors of both enzymes. *Biochem J* **2003**, *373*, 231–239.
- [113] Apletalina, E.; Appel, J.; Lamango, N. S.; Houghten, R. A.; Lindberg, I. Identification of inhibitors of prohormone convertases 1 and 2 using a peptide combinatorial library. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 26589–26595.
- [114] Cameron, A.; Appel, J.; Houghten, R. A.; Lindberg, I. Polyarginines are potent furin inhibitors. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 36741–36749.
- [115] Kacprzak, M.; Peinado, J.; Than, M.; Appel, J.; Henrich, S.; Lipkind, G.; Houghten, R.; Bode, W.; Lindberg, I. Inhibition of furin by polyarginine-containing peptides: nanomolar inhibition by nona-D-arginine. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 36788–36794.
- [116] Gagnon, H.; Beauchemin, S.; Kwiatkowska, A.; Couture, F.; D'Anjou, F.; Levesque, C.; Dufour, F.; Desbiens, A. R.; Vaillancourt, R.; Bernard, S.; Desjardins, R.; Malouin, F.; Dory, Y. L.; Day, R. Optimization of Furin Inhibitors To Protect against the Activation of Influenza Hemagglutinin H5 and Shiga Toxin. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 29–41.

- [117] Jiao, G.-S.; Cregar, L.; Wang, J.; Millis, S. Z.; Tang, C.; O'Malley, S.; Johnson, A. T.; Sareth, S.; Larson, J.; Thomas, G. Synthetic small molecule furin inhibitors derived from 2,5-dideoxystreptamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 19707–19712.
- [118] Kowalska, D.; Liu, J.; Appel, J.; Ozawa, A.; Nefzi, A.; Mackin, R.; Houghten, R.; Lindberg, I. Synthetic small-molecule prohormone convertase 2 inhibitors. *Mol Pharmacol* **2009**, *75*, 617–625.
- [119] Sielaff, F.; Than, M.; Bevec, D.; Lindberg, I.; Steinmetzer, T. New furin inhibitors based on weakly basic amidinohydrazones. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, *21*, 836–840.
- [120] Komiyama, T.; Coppola, J.; Larsen, M.; van, D.; Ross, B.; Day, R.; Rehemtulla, A.; Fuller, R. Inhibition of furin/proprotein convertase-catalyzed surface and intracellular processing by small molecules. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 15729–15738.
- [121] Coppola, J. M.; Bhojani, M. S.; Ross, B. D.; Rehemtulla, A. A small-molecule furin inhibitor inhibits cancer cell motility and invasiveness. *Neoplasia* **2008**, *10*, 363–370.
- [122] Podsiadlo, P.; Komiyama, T.; Fuller, R.; Blum, O. Furin inhibition by compounds of copper and zinc. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 36219–36227.
- [123] Basak, A.; Cooper, S.; Roberge, A. G.; Banik, U. K.; Chretien, M.; Seidah, N. G. Inhibition of proprotein convertases-1, -7 and furin by diterpines of *Andrographis paniculata* and their succinoyl esters. *Biochem J* **1999**, *338* (Pt 1), 107–113.
- [124] Becker, G. L. *Entwicklung, Synthese und Charakterisierung neuartiger Furininhibitoren*: Marburg, Dissertation, 2011.
- [125] Becker, G. L.; Lu, Y.; Harges, K.; Strehlow, B.; Levesque, C.; Lindberg, I.; Sandvig, K.; Bakowsky, U.; Day, R.; Garten, W.; Steinmetzer, T. Highly potent inhibitors of proprotein convertase furin as potential drugs for treatment of infectious diseases. *J Biol Chem* **2012**, *287*, 21992–22003.
- [126] Becker, G.; Harges, K.; Steinmetzer, T. New substrate analogue furin inhibitors derived from 4-amidinobenzylamide. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, *21*, 4695–4697.
- [127] Schechter, I.; Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **1967**, *27*, 157–162.
- [128] Michael R. Wiley; Nickolay Y. Chirgadze; David K. Clawson; Trelia J. Craft; Donetta S. Gifford-Moore; Noel D. Jones; Jennifer L. Olkowski; Leonard C. Weir; Gerald F. Smith. D-Phe-Pro-p-Amidinobenzylamine: A potent and highly selective thrombin inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1996**, *6*, 2387–2392.
- [129] Schweinitz, A.; Steinmetzer, T.; Banke, I. J.; Arlt, M. J. E.; Stürzebecher, A.; Schuster, O.; Geissler, A.; Giersiefen, H.; Zeslowska, E.; Jacob, U.; Kruger, A.; Sturzebecher, J. Design of Novel and Selective Inhibitors of Urokinase-type Plasminogen Activator with Improved Pharmacokinetic Properties for Use as Antimetastatic Agents. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 33613–33622.

- [130] Kadono, S.; Sakamoto, A.; Kikuchi, Y.; Oh-eda, M.; Yabuta, N.; Yoshihashi, K.; Kitazawa, T.; Suzuki, T.; Koga, T.; Hattori, K.; Shiraishi, T.; Haramura, M.; Kodama, H.; Ono, Y.; Esaki, T.; Sato, H.; Watanabe, Y.; Itoh, S.; Ohta, M.; Kozono, T. Structure-based design of P3 moieties in the peptide mimetic factor VIIa inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, 327, 589–596.
- [131] Stürzebecher, A.; Donneck, D.; Schweinitz, A.; Schuster, O.; Steinmetzer, P.; Stürzebecher, U.; Kotthaus, J.; Clement, B.; Stürzebecher, J.; Steinmetzer, T. Highly potent and selective substrate analogue factor Xa inhibitors containing D-homophenylalanine analogues as P3 residue: part 2. *ChemMedChem* **2007**, 2, 1043–1053.
- [132] Tian, S.; Huang, Q.; Fang, Y.; Wu, J. FurinDB: A database of 20-residue furin cleavage site motifs, substrates and their associated drugs. *Int J Mol Sci* **2011**, 12, 1060–1065.
- [133] Duckert, P.; Brunak, S.; Blom, N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Engineering Design and Selection* **2004**, 17, 107–112.
- [134] Igarashi, Y.; Eroshkin, A.; Gramatikova, S.; Gramatikoff, K.; Zhang, Y.; Smith, J. W.; Osterman, A. L.; Godzik, A. CutDB: a proteolytic event database. *Nucleic Acids Res* **2007**, 35, D546–9.
- [135] Becker, G.; Sielaff, F.; Than, M.; Lindberg, I.; Routhier, S.; Day, R.; Lu, Y.; Garten, W.; Steinmetzer, T. Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics. *J Med Chem* **2010**, 53, 1067–1075.
- [136] Joullié, M. M.; Lassen, K. M. Evolution of amide bond formation. *ARKIVOC* **2010**, 189–250.
- [137] Dixon, M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* **1953**, 55, 170–171.
- [138] Karle, I. L.; Balaram, P. Structural characteristics of alpha-helical peptide molecules containing Aib residues. *Biochemistry* **1990**, 29, 6747–6756.
- [139] Prongay, A. J.; Guo, Z.; Yao, N.; Pichardo, J.; Fischmann, T.; Strickland, C.; Myers, J.; Weber, P. C.; Beyer, B. M.; Ingram, R.; Hong, Z.; Prosise, W. W.; Ramanathan, L.; Taremi, S. S.; Yarosh-Tomaine, T.; Zhang, R.; Senior, M.; Yang, R.-S.; Malcolm, B.; Arasappan, A.; Bennett, F.; Bogen, S. L.; Chen, K.; Jao, E.; Liu, Y.-T.; Lovey, R. G.; Saksena, A. K.; Venkatraman, S.; Girijavallabhan, V.; Njoroge, F. G.; Madison, V. Discovery of the HCV NS3/4A Protease Inhibitor (1 R ,5 S)- N -[3-Amino-1-(cyclobutylmethyl)-2,3-dioxopropyl]-3- [2(S)-[[[(1,1-dimethylethyl)amino]carbonyl]amino]-3,3-dimethyl-1-oxobutyl]- 6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexan-2(S)-carboxamide (Sch 503034) II. Key Steps in Structure-Based Optimization. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 2310–2318.
- [140] Venkatraman, S. Discovery of boceprevir, a direct-acting NS3/4A protease inhibitor for treatment of chronic hepatitis C infections. *Trends in Pharmacological Sciences* **2012**, 33, 289–294.

- [141] Bold, G.; Fassler, A.; Capraro, H. G.; Cozens, R.; Klimkait, T.; Lazdins, J.; Mestan, J.; Poncioni, B.; Rosel, J.; Stover, D.; Tintelnot-Blomley, M.; Acemoglu, F.; Beck, W.; Boss, E.; Eschbach, M.; Hurlimann, T.; Masso, E.; Roussel, S.; Ucci-Stoll, K.; Wyss, D.; Lang, M. New aza-dipeptide analogues as potent and orally absorbed HIV-1 protease inhibitors: candidates for clinical development. *J Med Chem* **1998**, *41*, 3387–3401.
- [142] Bisel, P.; Al-Momani, L.; Müller, M. The tert-butyl group in chemistry and biology. *Org Biomol Chem* **2008**, *6*, 2655–2665.
- [143] Jacobson, I. C.; Reddy, P. G.; Wasserman, Z. R.; Hardman, K. D.; Covington, M. B.; Arner, E. C.; Copeland, R. A.; Decicco, C. P.; Magolda, R. L. Structure-based design and synthesis of a series of hydroxamic acids with a quaternary-hydroxy group in P1 as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, *8*, 837–842.
- [144] Gupta, M. K.; Mishra, P.; Prathipati, P.; Saxena, A. K. 2D-QSAR in hydroxamic acid derivatives as peptide deformylase inhibitors and antibacterial agents. *Bioorg Med Chem* **2002**, *10*, 3713–3716.
- [145] Morrison, J. F. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1969**, *185*, 269–286.
- [146] Copeland, R. A. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery*; Wiley: Hoboken, N.J, **2013**.
- [147] Artenstein, A. W.; Opal, S. M. Novel approaches to the treatment of systemic anthrax. *Clin Infect Dis* **2012**, *54*, 1148–1161.
- [148] Russell, C. J.; Webster, R. G. The genesis of a pandemic influenza virus. *Cell* **2005**, *123*, 368–371.
- [149] Klenk, H. D.; Garten, W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* **1994**, *2*, 39–43.
- [150] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- [151] Mahy, B. W. J.; Kangro, H. O. *Virology methods manual*; Academic Press: London, San Diego, **1996**.
- [152] López-Vallejo, F.; Martínez-Mayorga, K. Furin inhibitors: Importance of the positive formal charge and beyond. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20*, 4462–4471.
- [153] Dahms, S. O.; Hardes, K.; Becker, G. L.; Steinmetzer, T.; Brandstetter, H.; Than, M. E. X-ray Structures of Human Furin in Complex with Competitive Inhibitors. *ACS Chem Biol* **2014**, *9*, 1113–1118.
- [154] Hock, F. J.; Wirth, K.; Albus, U.; Linz, W.; Gerhards, H. J.; Wiemer, G.; Henke, S.; Breipohl, G.; König, W.; Knolle, J. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br J Pharmacol* **1991**, *102*, 769–773.
- [155] Wirth, K.; Hock, F. J.; Albus, U.; Linz, W.; Alpermann, H. G.; Anagnostopoulos, H.; Henk, S.; Breipohl, G.; König, W.; Knolle, J. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. *Br J Pharmacol* **1991**, *102*, 774–777.

- [156] Fevig, J. M.; Buriak, J., JR; Cacciola, J.; Alexander, R. S.; Kettner, C. A.; Knabb, R. M.; Pruitt, J. R.; Weber, P. C.; Wexler, R. R. Rational design of boro-peptide thrombin inhibitors: beta, beta-dialkyl-phenethylglycine P2 analogs of DuP 714 with greater selectivity over complement factor I and an improved safety profile. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, *8*, 301–306.
- [157] Zhu, B.-Y.; Jia, Z. J.; Zhang, P.; Su, T.; Huang, W.; Goldman, E.; Tumas, D.; Kadambi, V.; Eddy, P.; Sinha, U.; Scarborough, R. M.; Song, Y. Inhibitory effect of carboxylic acid group on hERG binding. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16*, 5507–5512.
- [158] Ponti, F. de; Poluzzi, E.; Montanaro, N. QT-interval prolongation by non-cardiac drugs: lessons to be learned from recent experience. *Eur J Clin Pharmacol* **2000**, *56*, 1–18.
- [159] Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, J.; Papaphotiu, G.; Sotiriu, P.; Wenqing, Y.; Schäfer, W. Darstellung geschützter Peptid-Fragmente unter Einsatz substituierter Triphenylmethyl-Harze. *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 3943–3946.
- [160] Manku, S.; Laplante, C.; Kopac, D.; Chan, T.; Hall, D. G. A mild and general solid-phase method for the synthesis of chiral polyamines. Solution studies on the cleavage of borane-amine intermediates from the reduction of secondary amides. *J Org Chem* **2001**, *66*, 874–885.
- [161] Sawant, R.; Torchilin, V. Intracellular transduction using cell-penetrating peptides. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 628.
- [162] Rawat, A.; Vaidya, B.; Khatri, K.; Goyal, A. K.; Gupta, P. N.; Mahor, S.; Paliwal, R.; Rai, S.; Vyas, S. P. Targeted intracellular delivery of therapeutics: an overview. *Pharmazie* **2007**, *62*, 643–658.
- [163] Mae, M.; Langel, U. Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr Opin Pharmacol* **2006**, *6*, 509–514.
- [164] Fuchs, S. M.; Raines, R. T. Internalization of cationic peptides: the road less (or more?) traveled. *Cell Mol Life Sci* **2006**, *63*, 1819–1822.
- [165] Milletti, F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discovery Today* **2012**, *17*, 850–860.
- [166] Green, M.; Ishino, M.; Loewenstein, P. M. Mutational analysis of HIV-1 Tat minimal domain peptides: Identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression. *Cell* **1989**, *58*, 215–223.
- [167] Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 10444–10450.
- [168] Futaki, S. Arginine-rich Peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* **2000**, *276*, 5836–5840.
- [169] Pooga, M.; Hallbrink, M.; Zorko, M.; Langel, U. Cell penetration by transportan. *FASEB J* **1998**, *12*, 67–77.

- [170] Kucukkilinc, T.; Ozer, I. Multi-site inhibition of human plasma cholinesterase by cationic phenoxazine and phenothiazine dyes. *Arch Biochem Biophys* **2007**, *461*, 294–298.
- [171] Zorko, M.; Langel, U. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2005**, *57*, 529–545.
- [172] Hallbrink, M.; Floren, A.; Elmquist, A.; Pooga, M.; Bartfai, T.; Langel, U. Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1515*, 101–109.
- [173] Joliot, A. H.; Triller, A.; Volovitch, M.; Pernelle, C.; Prochiantz, A. alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. *New Biol* **1991**, *3*, 1121–1134.
- [174] Prochiantz, A. Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr Opin Cell Biol* **2000**, *12*, 400–406.
- [175] Jia, H.; Lohr, M.; Jezequel, S.; Davis, D.; Shaikh, S.; Selwood, D.; Zachary, I. Cysteine-rich and basic domain HIV-1 Tat peptides inhibit angiogenesis and induce endothelial cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, *283*, 469–479.
- [176] Carrigan, C. N.; Imperiali, B. The engineering of membrane-permeable peptides. *Anal Biochem* **2005**, *341*, 290–298.
- [177] Holm, T.; Johansson, H.; Lundberg, P.; Pooga, M.; Lindgren, M.; Langel, U. Studying the uptake of cell-penetrating peptides. *Nat Protoc* **2006**, *1*, 1001–1005.
- [178] Mahmoudian, J.; Hadavi, R.; Jeddi-Tehrani, M.; Mahmoudi, A. R.; Bayat, A. A.; Shaban, E.; Vafakhah, M.; Darzi, M.; Tarahomi, M.; Ghods, R. Comparison of the Photobleaching and Photostability Traits of Alexa Fluor 568- and Fluorescein Isothiocyanate-conjugated Antibody. *Cell J* **2011**, *13*, 169–172.
- [179] Hatsuzawa, K.; Nagahama, M.; Takahashi, S.; Takada, K.; Murakami, K.; Nakayama, K. Purification and characterization of furin, a Kex2-like processing endoprotease, produced in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **1992**, *267*, 16094–16099.
- [180] Angliker, H.; Neumann, U.; Molloy, S. S.; Thomas, G. Internally quenched fluorogenic substrate for furin. *Anal Biochem* **1995**, *224*, 409–412.
- [181] Krysan, D. J.; Rockwell, N. C.; Fuller, R. S. Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 23229–23234.
- [182] Stein, R. L. Catalysis by human leukocyte elastase: III. Steady-state kinetics for the hydrolysis of p-nitrophenyl esters. *Arch Biochem Biophys* **1985**, *236*, 677–680.
- [183] Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J Org Chem* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [184] Stone, S. R.; Hofsteenge, J. Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry* **1986**, *25*, 4622–4628.
- [185] Zhou, Y.; Lindberg, I. Purification and characterization of the prohormone convertase PC1(PC3). *J Biol Chem* **1993**, *268*, 5615–5623.

- [186] Lamango, N. S.; Zhu, X.; Lindberg, I. Purification and enzymatic characterization of recombinant prohormone convertase 2: stabilization of activity by 21 kDa 7B2. *Arch Biochem Biophys* **1996**, 330, 238–250.
- [187] Bernatowicz, M. S.; Wu, Y.; Matsueda, G. R. 1H-Pyrazole-1-carboxamidine hydrochloride an attractive reagent for guanylation of amines and its application to peptide synthesis. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2497–2502.
- [188] Bodanszky, M.; Bodanszky, A. *The practice of peptide synthesis*; Springer-Verlag: Berlin, New York, 1994.
- [189] Schweinitz, A.; Stürzebecher, A.; Stürzebecher, U.; Schuster, O.; Stürzebecher, J.; Steinmetzer, T. New substrate analogue inhibitors of factor Xa containing 4-amidinobenzylamide as P1 residue: part 1. *Med Chem* **2006**, 2, 349–361.
- [190] Drake, B.; Patek, M.; Lebl, M. A Convenient Preparation of Monosubstituted N , N '-di(Boc)-Protected Guanidines. *Synthesis* **1994**, 1994, 579–582.
- [191] Katritzky, A. R.; Rogovoy, B. V. Recent developments in guanylation agents. *ARKIVOC*, 2005, 49–87.
- [192] Zumbuehl, A.; Jeannerat, D.; Martin, S. E.; Sohrmann, M.; Stano, P.; Vigassy, T.; Clark, D. D.; Hussey, S. L.; Peter, M.; Peterson, B. R.; Pretsch, E.; Walde, P.; Carreira, E. M. An amphotericin B-fluorescein conjugate as a powerful probe for biochemical studies of the membrane. *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, 43, 5181–5185.
- [193] Kurmanova, A.; Llorente, A.; Polesskaya, A.; Garred, O.; Olsnes, S.; Kozlov, J.; Sandvig, K. Structural requirements for furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, 357, 144–149.
- [194] Matrosovich, M.; Matrosovich, T.; Garten, W.; Klenk, H.-D. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virol J* **2006**, 3, 63.

7. Anhang

7.1. Verwendete Inhibitoren

| MI- | Sequenz | MW (g/mol) | K _i (nM) | IC ₅₀ (nM) |
|-------|--|---------------|------------------------|--------------------------|
| 0059 | 3-AMe-Phac-Val-Arg-4-Amba × 3 TFA | 893,31 | 48,2 | |
| 0060 | 4-AMe-Phac-Val-Arg-4-Amba × 3 TFA | 893,31 | 37,8 | |
| 0061 | 3-GMe-Phac-Val-Arg-4-Amba × 3 TFA | 935,79 | 164,0 | |
| 0062 | 4-GMe-Phac-Val-Arg-4-Amba × 3 TFA | 935,79 | 269,3 | |
| 0089 | 3-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Noragmatin × 4 TFA | 1187,00 | 0,49 | |
| 0090 | 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Noragmatin × 4 TFA | 1187,00 | 0,28 | |
| 0091 | 3-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Agmatin × 4 TFA | 1201,03 | 0,52 | |
| 0092 | 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-Agmatin × 4 TFA | 1201,03 | 0,22 | |
| 0227* | Phac-Arg-Gly-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1020,90 | 0,66 | |
| 0232* | Palmitoyl-Arg-Val-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1141,17 | | 50,0 |
| 0285* | Phac-Arg-Gly-Arg-4-Amba × 3 TFA | 978,82 | 44,3 | |
| 0286* | Phac-Arg-Ala-Arg-4-Amba × 3 TFA | 992,84 | 18,2 | |
| 0290* | Phac-Arg-Ile-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1034,92 | 0,67 | |
| 0291* | Phac-Arg-Leu-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1034,92 | 9,0 | |
| 0701* | 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba × 4 TFA | 1206,00 | 0,0076 | |
| 1102 | Phac-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba × 4 TFA | 1291,11 | 0,0563 | |
| 1103 | Phac-Arg-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba × 5 TFA | 1561,32 | 0,0138 | |
| 1104 | Phac-Arg-Ala-Arg-Val-Arg-4-Amba × 4 TFA | 1362,19 | 0,0459 | |
| 1105 | Phac-Ala-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba × 4 TFA | 1362,19 | 0,0491 | |
| 1115 | Phac-Arg-Nva-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1020,90 | 3,7 | |
| 1116 | Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1034,92 | 0,17 | |
| 1117 | Phac-Arg-Abu-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1006,87 | 2,1 | |
| 1130 | Tra-Arg-Val-Arg-4-Amba × 4 TFA | 1155,98 | 0,0913 | |
| 1131 | GTra-Arg-Val-Arg-4-Amba × 4 TFA | 1198,02 | 0,0576 | |
| 1132 | Palmitoyl-Ado-Arg-Val-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1286,33 | 203,5 | |
| 1133 | Palmitoyl-Ado-Ado-Arg-Val-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1431,49 | 45,2 | |
| 1134 | Phac-Arg-Cha-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1074,99 | 7,1 | |
| 1135 | Ava-Val-Arg-4-Amba × 3 TFA | 845,71 | 38,5 | |
| 1136 | 4-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba × 4 TFA | 1177,99 | 0,0224 | |
| 1137 | Phac-Arg-Nle-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1034,92 | 6,2 | |
| 1138 | Phac-Arg-Cpa-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1032,91 | 1,5 | |
| 1139 | Phac-Arg-Aib-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1006,87 | 279,0 | |
| 1140 | Phac-Arg-Tba-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1048,95 | 2,0 | |
| 1141 | Ac-RQIKIWFQNRMRMKWKRRVR-4-Amba × 10 TFA | 3971,68 | | 18,97 |
| 1142 | Ac-YGRKKRRQRRVR-4-Amba × 10 TFA | 3128,59 | | 11,99 |
| 1143 | Ac-AGYLLGKINLKALAALAKKILRVR-4-Amba × 7 TFA | 3565,61 | | 22,76 |
| 1144 | Ac-RRRRRRRVR-4-Amba × 9 TFA | 2836,27 | | 10,66 |
| 1145 | Phac-Arg-Lys(Palmitoyl)-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1288,35 | 3814 | |
| 1146 | Gua-Ava-Val-Arg-4-Amba × 3 TFA | 887,75 | 2,5 | |
| 1147 | Phac-Arg-Adg-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1113,04 | 48,2 | |
| 1148 | 4-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba × 4 TFA | 1220,03 | 0,0055 | |
| 1149 | 3-AMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba × 4 TFA | 1177,99 | 0,0361 | |
| 1150 | 3-GMe-Phac-Arg-Tle-Arg-4-Amba × 4 TFA | 1220,03 | 0,0068 | |
| 1151 | Ava-Tle-Arg-4-Amba × 3 TFA | 859,74 | 26,7 | |
| 1152 | Gua-Ava-Tle-Arg-4-Amba × 3 TFA | 901,78 | 1,26 | |
| 1158 | H-Arg-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba × 6 TFA | 1557,21 | 0,0337 | |
| 1182 | Phac-Arg-Pen-Arg-4-Amba × 3 TFA | 1052,96 | 0,25 | |
| 1183 | 4-AMe-Phac-Arg-Glu-Arg-4-Amba × 4 TFA | 1193,95 | 2,68 | |
| 1184 | H-dArg-Arg-Arg-Val-Arg-4-Amba × 6 TFA | 1557,21 | 0,0283 | |
| 1185 | H-dArg-dArg-Arg-Val-Arg-4-Amba × 6 TFA | 1557,21 | 0,0510 | |
| 1186 | H-dArg-dArg-dArg-Arg-Val-Arg-4-Amba × 7 TFA | 1827,42 | 0,0754 | |
| 1187 | H-dArg-dArg-dArg-dArg-Arg-Val-Arg-4-Amba × 8 TFA | 2097,62 | 0,0943 | |
| 1188 | 4-GMe-Phac-Arg-Glu-Arg-4-Amba × 4 TFA | 1235,99 | 0,58 | |
| 1189 | 4-GMe-Phac-Arg-Lys(β-Ala)-Arg-4-Amba × 5 TFA | 1420,15 | 0,0222 | |
| 1190 | 4-GMe-Phac-Arg-Lys(β-Ala-Fluorescein)-Arg-4-Amba × 4 TFA | 1695,50 | 0,50 | |

* Diese Verbindungen wurden von Dr. Gero Becker synthetisiert.¹²⁴

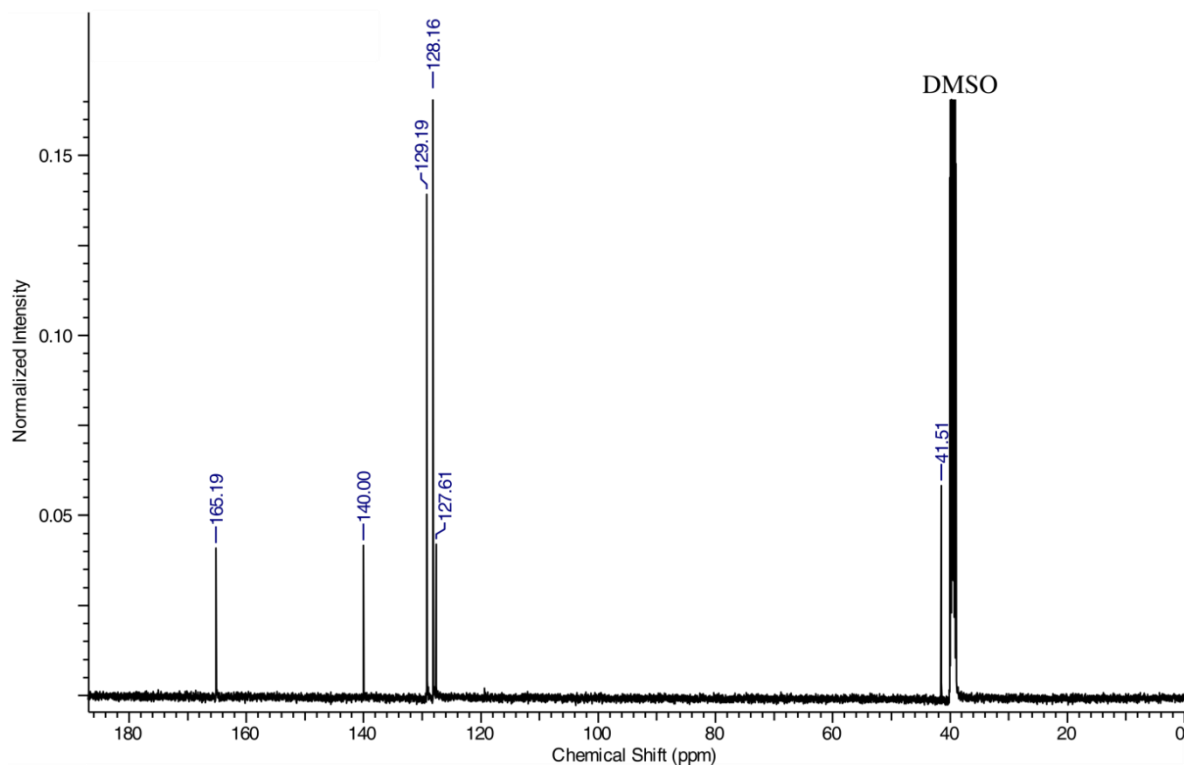
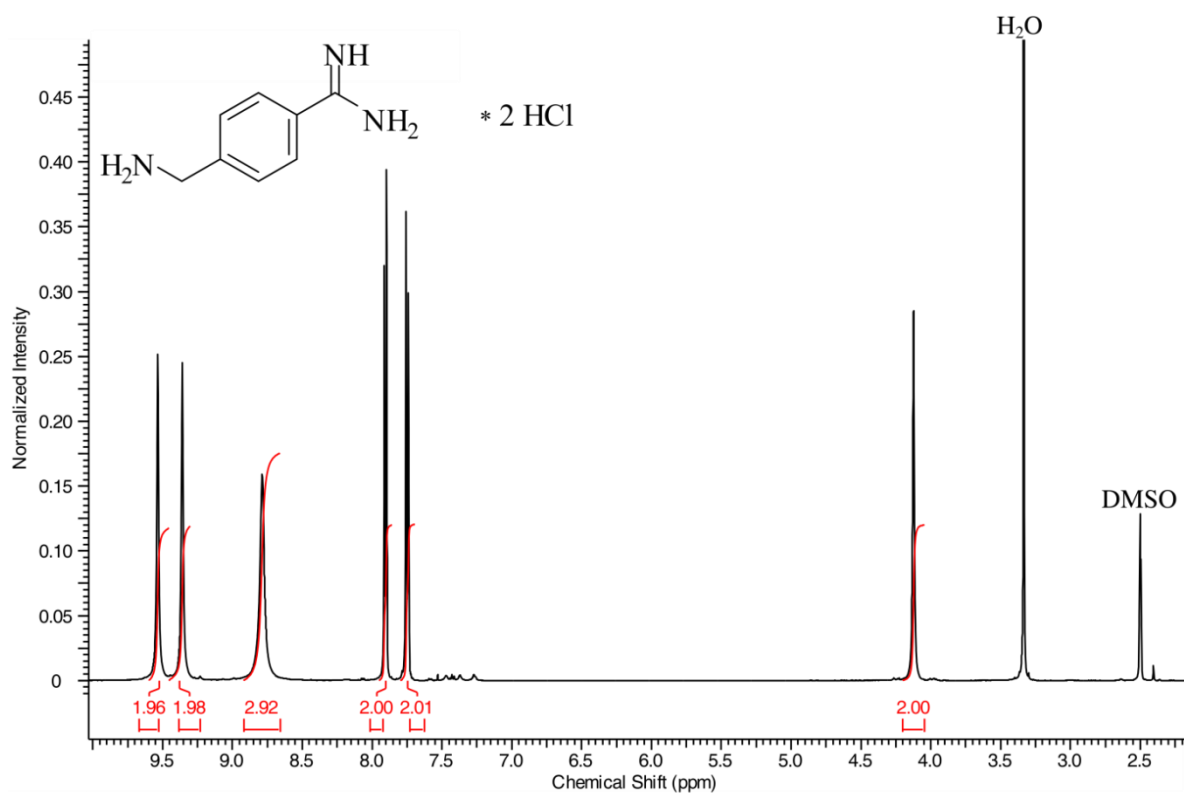
7.2. Verwendete Messparameter des Tecan Safire²

Für die enzymkinetischen Messungen der Inhibitoren wurden die in Tabelle 20 aufgeführten Messparameter verwendet.

Tabelle 20: Messparameter des Tecan Safire² während der enzymkinetischen Messungen.

| Parameter | Wert |
|------------------------------|------------------------|
| XFLUOR4 Version | V 4.51 |
| Firmware | V 1.60 07/2006 Safire2 |
| Serial number | 12904200017 |
| Measurement mode | Fluorescence Top |
| Excitation wavelength | 380 nm |
| Emission wavelength | 460 nm |
| Excitation bandwidth | 12 nm |
| Emission bandwidth | 12 nm |
| Gain (Manual) | 90 |
| Number of reads | 10 |
| Flash Mode | High sensitivity |
| Integration time | 2000 µs |
| Lag time | 0 µs |
| Plate definition file | NUN96ftNEW.pdf |
| Z-Position (Manual) | 7107 µm |
| Number of kinetic cycles | 40 |
| Kinetic interval (Minimal) | 33 s |
| Shake duration (Orbital low) | 15 s |

7.3. NMR-Spektren

Abbildung 45: ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum des 4-Amidinobenzylamins $\times 2 \text{HCl}$ in $\text{DMSO}-d_6$.

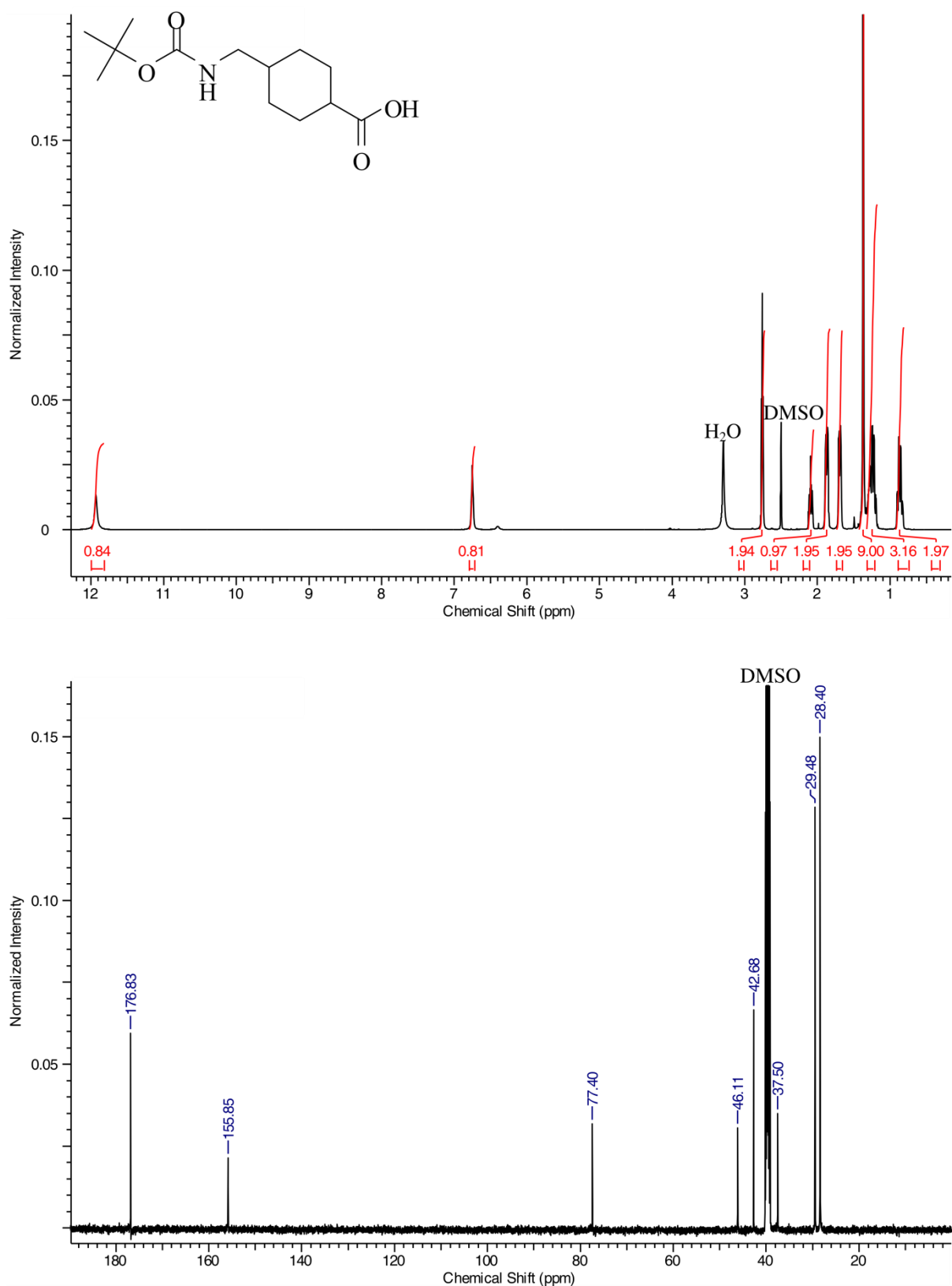
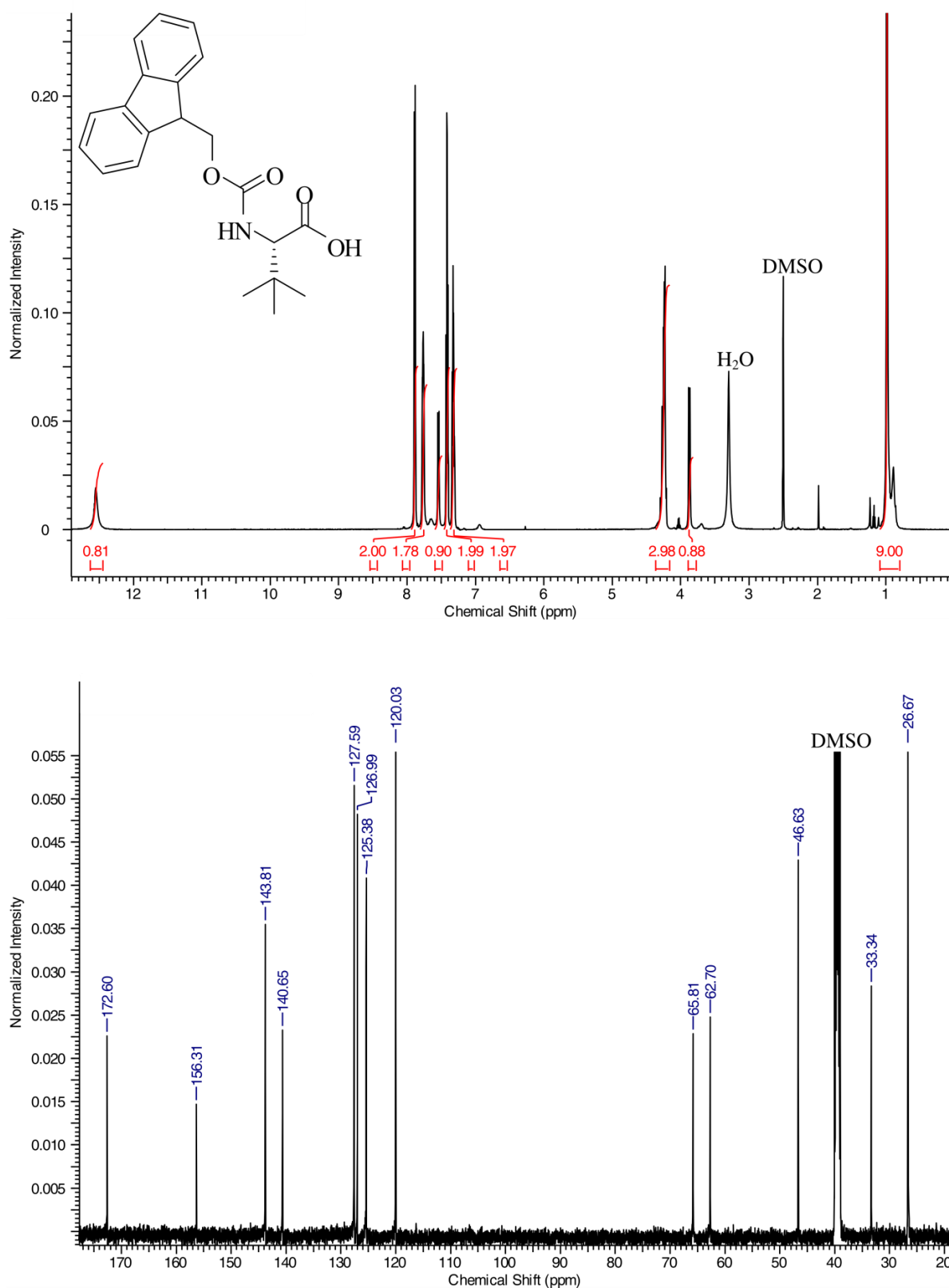


Abbildung 46: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektrum der Boc-Tranexamsäure in DMSO-*d*₆.

Abbildung 47: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektrum des Fmoc-Tle-OH in DMSO-*d*₆.

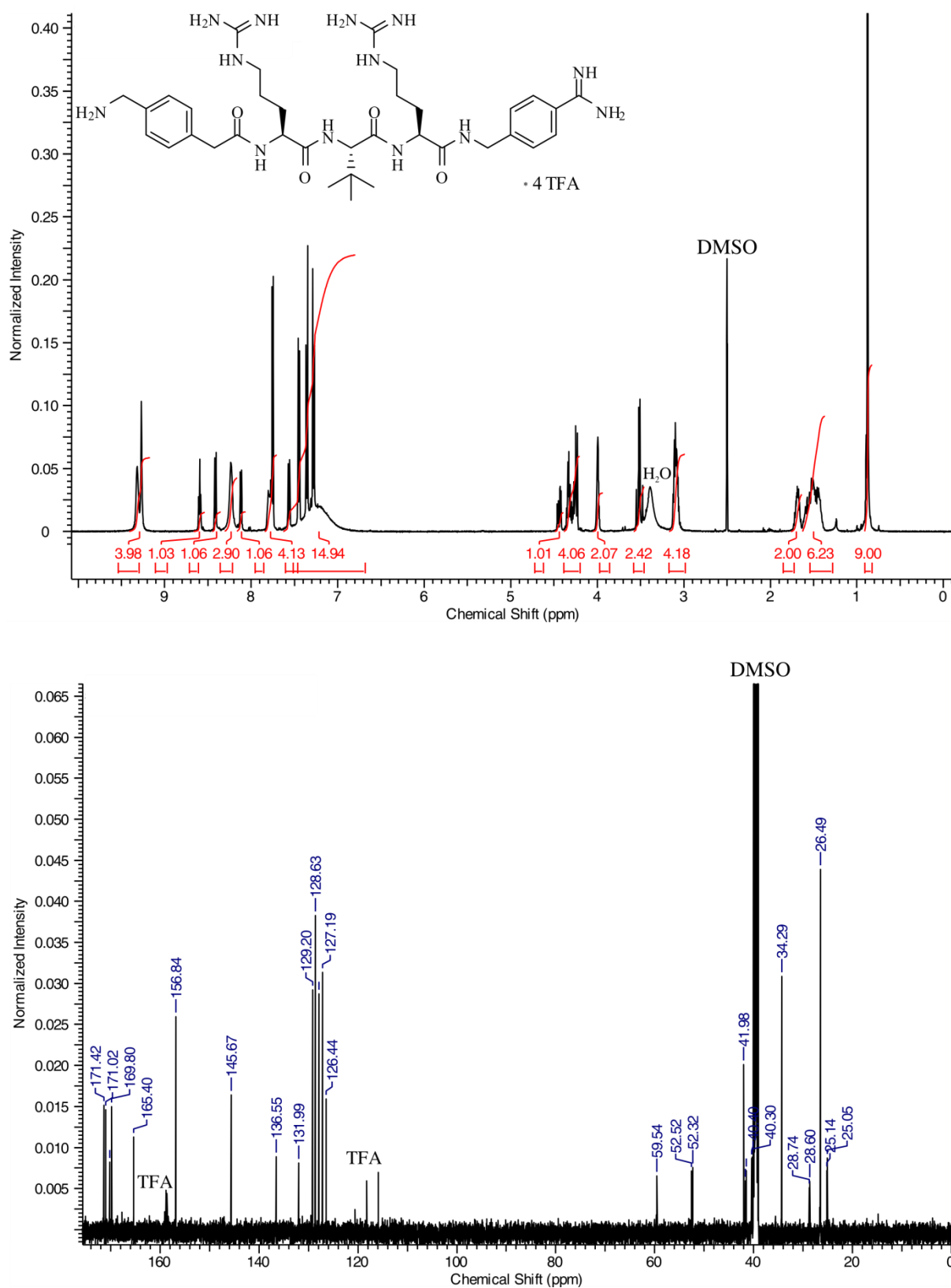
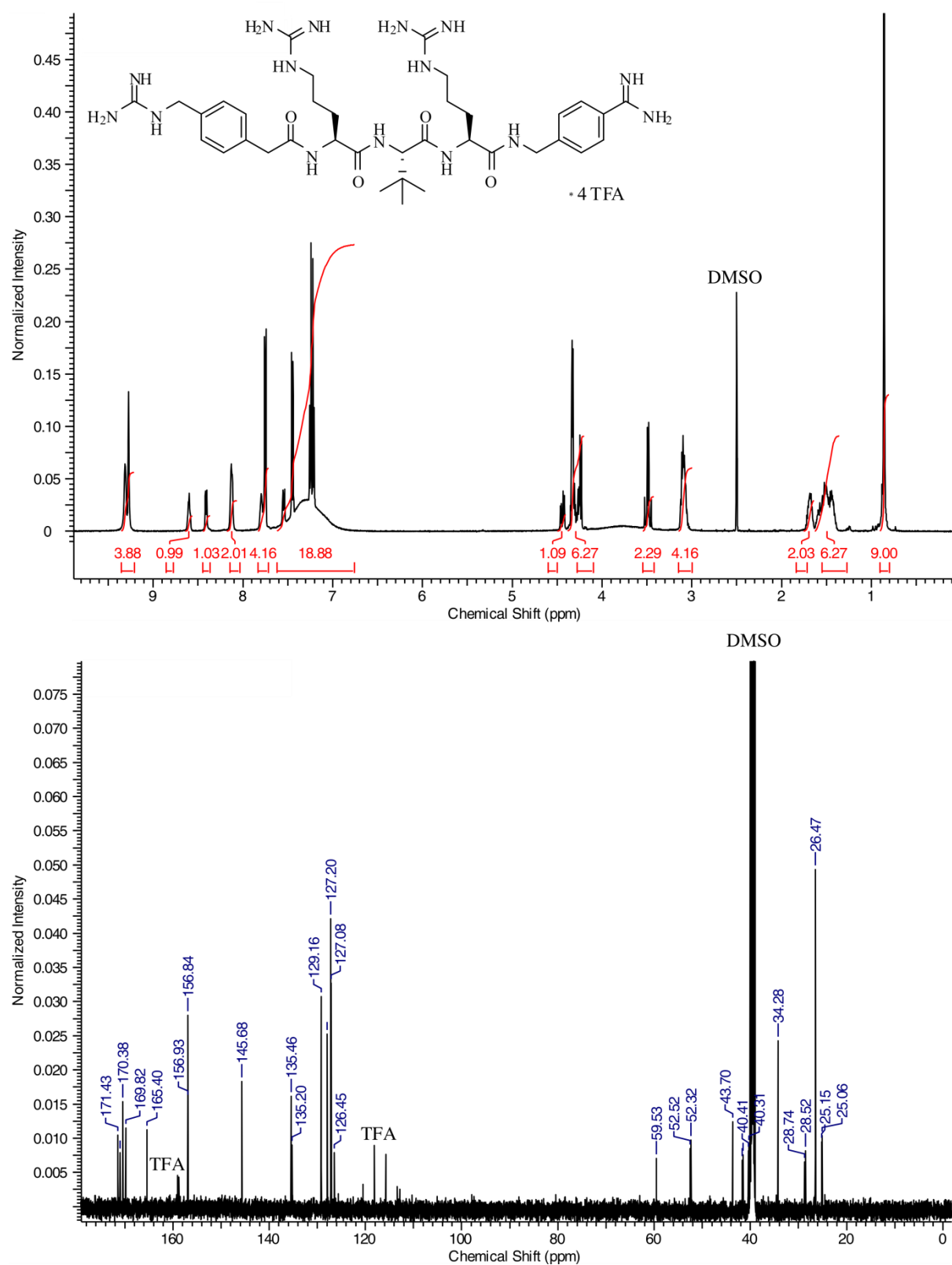


Abbildung 48: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektrum des Inhibitors MI-1136 in DMSO-*d*₆.

Abbildung 49: ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum des Inhibitors MI-1148 in $\text{DMSO}-d_6$.

7.4. Zellkulturversuche mit Anthrax

Die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Beyer (Universität Hohenheim) von Susanne Köhler durchgeführt.

200 µL murine Makrophagen J774A.1 Zellen (5×10^5 Zellen/mL; *German collection of microorganisms and cell cultures*, Braunschweig, Germany) wurden über Nacht in einer 96-well Platte (Becton Dickinson Labware, Heidelberg) mit RPMI:DMEM (1:1, versetzt mit 10 % FCS) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zu den Zellen wurde eine Lösung mit protektivem Antigen (PA, 500 ng/ml im Assay), Letal Faktor (LF, 100 ng/ml im Assay) und unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen (0,05 – 100 µM im Assay) in 95 % DMEM und 5 % FCS gegeben. PA und LF stammen von List Biological Laboratories, Inc., Campbell, USA. Die Zellen wurden für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 25 µL MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) zu jedem well gegeben und die Zellen erneut für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ unter Lichtausschluss inkubiert. Nach der Zelllyse mit 100 µL 90 % Isopropanol (v/v), 0,5 % SDS (w/v) und 25 mM HCl erfolgte die Messung der Absorption jedes wells in einem Mikrotiterplattenleser (Model 680, Biorad Laboratories, Hercules, CA) bei 540 nm. Die Messungen wurden mit der Referenz korrigiert (keine Zellen, Probenmedium ohne Toxin). Der prozentuale Schutzwert wurde mittels Formel 9 bestimmt.

Formel 9: Gleichung zur Berechnung des prozentualen Schutzwertes. (OD_{Probe}: Wert der optischen Dichte der vermessenen Probe, OD_{Toxinkontrolle}: Wert der optischen Dichte der Toxinkontrolle, OD_{Mediumkontrolle}: Wert der optischen Dichte in Abwesenheit des Toxins)

$$\text{Schutzwert (\%)} = \frac{OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{Toxinkontrolle}}}{OD_{\text{Mediumkontrolle}} - OD_{\text{Toxinkontrolle}}} \times 100$$

7.5. Zellkulturversuche mit Diphtherietoxin

Die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Sandvig (Universität Oslo) durchgeführt.

Für das Experiment wurden Vero-Zellen verwendet, die in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) kultiviert wurden.¹⁹³ Einen Tag vor dem Experiment wurden die Zellen in einer 24-well Platte mit einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro well kultiviert. Die Zellen wurden ohne und mit den Inhibitoren (100 nM im Vortest und 2, 10 und 50 nM bei der Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit) in Leucin- und Serum-freien Medium für 30 Minuten inkubiert. Dann wurde Diphtherietoxin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; 0,1, 1, 10 und 100 ng/ml im Assay) zu den Zellen gegeben. Nach 3 h wurden die Zellen in Hepes-

Medium mit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]Leucin (Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) ohne Zugabe von unmarkiertem Leucin für 20 Minuten inkubiert. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit 5 % Trichloressigsäure gewaschen, in 0,1 M KOH gelöst und dann die Radioaktivität bestimmt.

7.6. Zellkulturversuche mit Influenza

Die Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Garten (Philipps-Universität Marburg) von Dr. Yinghui Lu durchgeführt.

7.6.1. Verwendete Zellkulturen, Virusstämme und Inhibitorlösungen

Für die Versuche zur Virusausbreitung wurde eine *Madin-Darby canine kidney II* –Zelllinie verwendet, die in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit Penicillin, Streptomycin, Glutamin und 10 % fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert wurde.

Die aviären Influenzaviren des Typs A/FPV/Rostock/34 (H7N1) und A/Thailand/1(KAN-1)/2004 (H5N1) wurden in embryonalen Hühnereiern herangezogen. Die Virus enthaltende, allantoide Flüssigkeit wurde durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C geklärt und anschließend bei – 80 °C gelagert.

Von den verwendeten Inhibitoren wurde eine 10 mM Stammlösung in DMSO hergestellt und bei – 20 °C gelagert. Die weiteren Verdünnungen wurden in DMEM ohne FCS vor der Verwendung hergestellt.

7.6.2. Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizität der verwendeten Inhibitoren auf die Viabilität der MDCK II-Zellen wurde mittels eines MTT-Tests bestimmt.¹⁵⁰ Hierfür wurden die Zellen in 96-well Platten bis zur Konfluenz gezogen. Die Zellen wurden mit den Inhibitoren in Konzentrationen von 25 und 50 μM für 24 und 48 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 50 μL MTT-Lösung (0,5 mg/mL in DMSO) versetzt. Nach einer weiteren Inkubation über 2 h bei 37 °C wurde die MTT-Lösung entfernt. Die gebildeten Formazankristalle wurden durch Zugabe von 100 μL DMSO gelöst. Nach 10 Minuten Schütteln erfolgte die quantitative Bestimmung der lebenden Zellen durch ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) Mikroplattenleser bei 570 nm.

7.6.3. Immunfärbung

MDCK II-Zellen wurden in 24-*well* Platten bis zu einer Konfluenz von 100 % gezogen. Die Infektion der Zellen erfolgte mit 200 μ L einer A/FPV/Rostock/34 (H7N1) oder A/Thailand/1(KAN-1)/2004 (H5N1) enthaltenden allantoiden Flüssigkeit bei einer MOI von 0,001 bei 37 °C für 1 h. Dann wurde das Virus-enthaltende Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Inhibitoren (verdünnt in Medium) oder reinem Medium als Referenz versetzt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellkulturen wurden mit 4 % Paraformaldehyd in *Minimal Essential Medium* (MEM, Gibco) fixiert, mit PBS gewaschen und mit 0,3 % Triton-X-100 in PBS über 20 Minuten permeabilisiert. Die Zellen wurden 5 Minuten mit 0,05 % Tween in PBS gewaschen. Infizierte Zellen wurden immunhistochemisch durch Zugabe eines FPV-Antikörpers (Hase, 1:3500) für 1 h und anschließend mit einem sekundären Antikörper gegen Hase (vom Esel), konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP, 1:3500), inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit 0,05 % Tween in PBS über 5 Minuten wurde das Peroxidase-Substrat Trueblue (1,2-Bis(5-amidino-2-benzofuranyl)ethyldiaceturat (KPL, Gaithersburg, MD, Vereinigte Staaten)) zu den Zellen gegeben. Die Reaktion wurde durch Waschen mit H₂O gestoppt.¹⁹⁴

7.7. Zellkulturversuche mit CDV

VerosSLAMdogtag Zellen wurden mit 50, 5, 0,5, 0,05 μ M Inhibitorlösung oder als Kontrolle mit reinem Medium versetzt. Bei einer MOI von 0,01 wurden die Zellen mit CDV infiziert. Nach 24, 48 und 72 h p.i. wurden Proben genommen. Die viralen Titer im Überstand und der zellulären Fraktion wurden mittels TCID₅₀ bestimmt.

8. Danksagung

Prof. Dr. Steinmetzer danke ich für die interessante Themenstellung dieser Arbeit, die fachlichen Ratschläge und die hervorragende Betreuung. Ein großer Dank auch für das geduldige Lesen und Korrigieren dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Garten bedanke ich mich für die Bereitschaft als Zweitgutachter zu fungieren und für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Testung der Inhibitoren in Zellkultur in seiner Arbeitsgruppe.

Prof. Dr. Petersen und Prof. Dr. Diederich danke ich für ihre Bereitschaft in der Prüfungskommission mitzuwirken.

Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die Bereitstellung des Furins sowie PC1/3 und PC2 danke ich Prof. Dr. Lindberg. Weiterhin möchte ich Dr. Yinghui Lu für die tolle Zusammenarbeit bei der Testung von Inhibitoren gegen die Ausbreitung von Influenzaviren danken. Ein großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Beyer und seine Doktorandin Susanne Köhler für die Testung der Inhibitoren gegen Anthraxtoxin. Prof. Dr. Sandvig und ihrer Arbeitsgruppe danke ich für die Experimente mit Diphtherietoxin in Zellkultur und Prof. Dr. von Messling für die Testung der Inhibitoren gegen die Ausbreitung des Hundestaupevirus. Bei PD Dr. Manuel Than und Dr. Sven Dahms bedanke ich mich für die Lösung der Kristallstruktur des humanen Furins. Ein großes Dankeschön auch an Dr. Eva Friebertshäuser für die Hilfe und Anleitung zu den Lokalisationsuntersuchungen des FITC-Inhibitors.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die angenehme Zusammenarbeit, freundliche Atmosphäre und die schöne Zeit bei diversen Grillabenden, Wanderungen und Paddeltouren. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Gero Becker, Dr. Frank Sielaff und Dr. Daniela Meyer, die immer ein offenes Ohr hatten und bei Fragen immer ansprechbar waren. Vielen Dank für eure Hilfestellungen und Unterstützung.

Ein großes Dankeschön auch an unseren Auszubildenden Dominik Felix für die zahlreichen Synthesen und die Unterstützung bei zahlreichen praktischen Arbeiten und an Heike Lang-Henkel für die Unterstützung bei enzymkinetischen Messungen.

Mein besonderer Dank geht an Kathleen Hille für die Unterstützung und Hilfe bei der praktischen Arbeit in jeglicher Hinsicht. Vielen, vielen Dank für die schöne Zeit in- und außerhalb der Universität.

Ich möchte mich bei allen alten und jetzigen Assistenten des ersten Semesters für die lustigen Dienste bedanken. Ein großes Dankeschön auch an dieser Stelle nochmal an Dr. Frank Sielaff und Dr. Daniela Meyer für die Einweisung in den organisatorischen Ablauf des 1. Semesters.

Den Wahlpflichtpraktikanten Kathrina Quell, Ghaleb Mahmoud und Abdullah Tümer sowie den Vertiefungspraktikanten Johannes Pester, Alina Hanlon, David Weimer und Mohy Omar danke ich für die geleistete Arbeit. Ein großes Dankeschön geht auch an Teodora Ivanova für die schöne Zusammenarbeit.

Nina Zitzer möchte ich für die Aufnahme der Massenspektren, Stefan Newel für die NMR-Messungen und Hans Dörr für die Elementaranalytik danken.

Für das mehrfache Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich Franz Hardes, meinem Vater und André danken.

Bei meinen Freunden aus Paderborn bedanke ich mich für ihr Verständnis und die Geduld, während des Studiums und vor allem der Doktorarbeit.

Von ganzem Herzen danke ich André für seine Liebe, den stetigen Rückhalt und vor allem seine Ruhe in stressigen Zeiten. Der größte Dank geht an meinen Vater, ohne dessen stetige Unterstützung und Ermutigung die Arbeit nicht möglich gewesen wäre!

9. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

| | |
|---------------|-------------------------|
| Name | Kornelia Hardes |
| Geburtsdatum | 10.10.1985 in Paderborn |
| Familienstand | ledig |

AUSBILDUNG

| | |
|--------------------|---|
| Seit 01/2011 | Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps Universität Marburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Steinmetzer |
| 01/2011 | Approbation als Apothekerin |
| 07/2010 – 12/ 2010 | Alme Apotheke, Paderborn |
| 01/2010 – 06/ 2010 | Diplomandin im Arbeitskreis von Prof. Dr. Steinmetzer, Pharmazeutische Chemie, Philipps Universität Marburg |
| 2005 – 2009 | Studium der Pharmazie an der Philipps Universität Marburg |
| 1995 - 2005 | Goerdeler Gymnasium, Paderborn Abschluss: Abitur |
| 1992 - 1995 | Dionysiuschule Elsen |

10. Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

„Synthese, Charakterisierung und Anwendung neuer Inhibitoren der Proteinkonvertase Furin“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den.....

.....
(Unterschrift mit Vor- und Zuname)